



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO SOLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA- SOLOS E NUTRIÇÃO DE
PLANTAS

PETTERSON COSTA CONCEIÇÃO SILVA

PAPEL DA GLUTAMINA NA REGULAÇÃO DO INFLUXO DE NITRATO EM
RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPÍ EXPOSTAS À SALINIDADE

FORTALEZA
2015

PETTERSON COSTA CONCEIÇÃO SILVA

**PAPEL DA GLUTAMINA NA REGULAÇÃO DO INFLUXO DE NITRATO EM
RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPÍ EXPOSTAS À SALINIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Solos e Nutrição de Plantas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenisio
Gomes da Silveira

**FORTALEZA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S582p Silva, Peterson Costa Conceição.
Papel da glutamina na regulação do influxo de nitrato de raízes de feijão-caupí exposta à salinidade. / Peterson Costa Conceição Silva. – 2015
92 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias Departamento de Ciências do Solo, Programa de Pós Graduação em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas), Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Fertilidade do Solo, Adubação e Nutrição de Plantas
Orientação: Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes Silveira.
Coorientação: Prof. Dr. Rafael Magalhães de Aragão.
1. Salinidade. 2. Plantas - Efeito do sal. 3. Feijão - Brasil. I. Título.

PETTERSON COSTA CONCEIÇÃO SILVA

**PAPEL DA GLUTAMINA NA REGULAÇÃO DO INFLUXO DE NITRATO EM
RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPÍ EXPOSTAS À SALINIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Solos e Nutrição de Plantas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

Aprovada em: 14/12/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rafael Magalhães de Aragão (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Evandro Nascimento da Silva
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.
À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira, pela orientação de excelência, pelos ensinamentos sobre o desenvolvimento de uma Pesquisa Científica de qualidade. Gostaria de deixar um agradecimento especial pela atenção dada, pela preocupação, apoio e compreensão nas horas que mais precisei.

Aos participantes da banca examinadora, pelas valiosas colaborações e pelas dicas para melhoria do meu trabalho de pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela disponibilidade da estrutura física e materiais de trabalho.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em salinidade pela disponibilidade de equipamentos de uso laboratorial.

Ao grupo de pesquisa Labplant, em referência a todas as pessoas que fizeram ou ainda fazem parte do grupo, pelos momentos de troca de conhecimentos obtidos, reflexões e apoio ao desenvolvimento do trabalho de pesquisa e pela imprescindível amizade e companheirismo.

RESUMO

Existem muitos estudos mostrando que a salinidade pode afetar a absorção de nitrato de forma direta, a partir do seu efeito osmótico, da natureza do sal e de sua composição iônica. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos relacionados com a capacidade do sal em inibir a aquisição de nitrato de forma indireta. O presente estudo teve como objetivo induzir a inibição do influxo de NO_3^- em raízes de feijão-caupí de forma indireta desencadeada por um mecanismo de *feedback* negativo, provocado pelo aumento no *pool* de aminoácidos livres no tecido, induzido por estresse salino. Para isso, foram realizados três estudos isolados e contínuos. A aplicação de glutamina exógena promoveu um aumento no conteúdo de aminoácidos livres. A presença de glutamina reduziu significativamente a aquisição de nitrato. O amônio livre também pode ser listado como um composto-chave no papel da regulação do influxo de nitrato, pois a utilização do MSO (Metionina sulfoximina) promoveu o aumento do conteúdo de NH_4^+ e também reduziu o influxo de nitrato, porém em menor grau quando comparado ao o tratamento com AZA (Azaserina). O estresse salino causou uma redução no influxo de NO_3^- , pela diminuição no crescimento das plantas induzida pelo sal. Adicionalmente, estes dados indicaram que esta redução no influxo está ligada ao aumento do teor de aminoácidos, principalmente a glutamina, que é o principal componente para atuar como sinal na regulação por *N-feedback*.

Palavras – chave: Absorção de nitrato, estresse salino, regulação por *feedback*, aminoácidos livres.

ABSTRACT

There are many studies showing that the salinity may directly affect the nitrate uptake, from their osmotic effect, nature of the salt and its ionic composition. However, little is known about the mechanisms related to the salt ability to inhibit the nitrate acquisition indirectly. This study was carried with aim to induce inhibition of NO_3^- influx in cowpea roots of indirect form triggered by a negative feedback mechanism, caused by the increase in the pool of free amino acids in the tissue, induced by salt stress. For this, were done three isolated studies and continuous. The exogenous glutamine application promoted an increase in the free amino acids content. The presence of glutamine decreased significantly the nitrate acquisition. The free ammonium can also be listed as a key-compound in the role of nitrate influx regulation, since use of the MSX (Methionine sulfoximine) promoted the increase of NH_4^+ content and also reduced nitrate influx, but, in a lesser degree when compared to treatment with AZA (Azaserine). Salt stress caused a reduction in NO_3^- influx by decrease in the growth of plants induced by salt. The data indicated which this reduction in the influx is triggered by increase of amino acids content, mainly the glutamine, that is main likely compound to act as signal in the N-feedback regulation.

Keyword: Nitrate uptake, salt stress, feedback regulation, free amino acids.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Processo de redução do nitrato através da enzima RN. 19
- Figura 2 - Processo de redução do nitrito através da RNi. 20
- Figura 3 - Processo de incorporação do amônio para formação de aminoácido através da enzima GS..... 21
- Figura 4 - Influxo de nitrato em raízes de Caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Dados médios de quatro repetições ±DP..... 39
- Figura 5 - Conteúdo de nitrato em raízes de Caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p<0,05). Dados médios de quatro repetições ±DP. 40
- Figura 6 - Conteúdo de amônio em raízes de Caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p<0,05). Dados médios de quatro repetições ±DP. 41
- Figura 7 - Conteúdo de aminoácidos livres em raízes de caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p<0,05). Dados médios de quatro repetições ±DP..... 43
- Figura 8 - Influxo de glutamina em raízes de Caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Dados médios de quatro repetições ±DP..... 44
- Figura 9 - Inibidores da rota de assimilação de amônio em plantas. 1 redutase de nitrato; 2 redutase de nitrito; 3 glutamina sintetase; 4 glutamato sintase. 54
- Figura 10 - Influxo de nitrato em raízes de Caupí. As raízes foram pré-tratadas por um período de 6 horas com inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Dados médios de quatro repetições ± DP. 60
- Figura 11 - Conteúdo de nitrato em raízes de Caupí. As raízes foram pré-tratadas por um período de 6 horas com inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p<0,05). Dados médios de quatro repetições ±DP..... 61
- Figura 12 - Conteúdo de amônio em raízes de Caupí. As raízes foram pré-tratadas por um período de 6 horas com inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina

sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 , pH $6,0 \pm 0,4$. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados médios de quatro repetições \pm DP. 62

Figura 13 – Conteúdo de aminoácidos livres em raízes de Caupí. As raízes foram pré-tratadas por um período de 6 horas com inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 , pH $6,0 \pm 0,4$. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados médios de quatro repetições \pm DP. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva, seguindo as concentrações propostas por Hoagland e Arnon (1950) e diluída a ½ força iônica.	35
Tabela 2 - Efeito do suprimento exógeno de glutamina (0 e 10 mM Gln) sobre o conteúdo de Aspartato (Asp), Glutamato (Glu), Serina (Ser), Glutamina (Gln) and Asparagina (Asn) em raízes de Caupí. Dados médios de quatro repetições ±DP.	45
Tabela 3 - Composição da solução nutritiva, seguindo as concentrações propostas por Hoagland e Arnon (1950) e diluída a ½ força iônica.	56
Tabela 4 - Efeito dos inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA) sobre o conteúdo de Aspartato (Asp), Glutamato (Glu), Serina (Ser), Glutamina (Gln) e Asparagina (Asn) em raízes de Caupí. Dados médios de quatro repetições ±DP.	64

LISTA DE ABREVEATURAS

AA	AMINO ACIDS
ANOVA	ANÁLISE DE VARIÂNCIA
ASN	ASPARAGINA
ASP	ASPARTATO
AT	ARABDOPSIS THALIANA
ATP-ase	ADENOSINA TRIFOSFATASE
AW	TROPICAL SEMIÚMIDO
AZA	AZASERINA
Ca(NO ₃) ₂	NITRATO DE CÁLCIO
Ca ²⁺	CÁTION DE CÁLCIO
CaCl ₂	CLORETO DE CÁLCIO
CH ₃ COOH	ÁCIDO ACÉTICO
CH ₃ COONa	ACETATO DE SÓDIO
HATS	SISTEMA DE TRANSPORTE DE ALTA AFINIDADE
Cl ⁻	ÂNION DE CLORO
CLAE	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
CNPqB	CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO
CONT	CONTROLE
CuSO ₄	SULFATO DE COBRE
DM	DRY MASS
DP	DESVIO PADRÃO
Fe-EDTA	ÁCIDO ETILENO DIAMINOTRETRACÉTICO-FERRO
FM	FRESH MASS
GDH	GLUTAMATO DESIDROGENASE
GLN	GLUTAMINA
GLU	GLUTAMATO
GOGAT	GLUTAMATO SINTASE
GS	GLUTAMINA SINTETASE
H ⁺	CÁTION DE HIDROGÊNIO
H ₂ O	ÁGUA
H ₃ BO ₃	ÁCIDO BÓRICO
HCO ₃	ÁCIDO CARBÔNICO
HV	HORDEUM VULGARE L
K ⁺	CÁTION DE POTÁSSIO
K ₂ SO ₄	SULFATO DE POTÁSSIO
KCN	CIANETO DE POTÁSSIO
KH ₂ PO ₄	FOSFATO DE POTASSIO
KM	COSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN
KNO ₃	NITRATO DE POTASSIO
LABPLANT	LABORATÓRIO DE METABOLISMO DE PLANTAS
LATS	SISTEMA DE TRANSPORTE DE BAIXA AFINIDADE

LSD	LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE
M:C:W	METANOL:CLOROFÓRMIO:ÁGUA
MES	2-MORPHOLINOS-ETANESULFÓNICO ÁCIDO
MF	MASSA FRESCA
Mg ²⁺	CÁTION DE MAGNÉSIO
MgSO ₄	SULFATO DE MAGNÉSIO
MnCl ₂	CLORETO DE MANGANÊS
MS	MASSA SECA
MSO	METIONINA SULFOXIMINA
MSX	METHIONINE SULFOXIMINE
N	NITROGÊNIO
Na ⁺	CÁTION DE SÓDIO
Na ₂ HPO ₄	FOSFATO DE SÓDIO
Na ₂ MOO ₄	MOLIBIDATO DE SÓDIO
NaCl	CLORETO DE SÓDIO
NaClO	HIPOCLORÍTO DE SÓDIO
NADH	NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO
NADPH	FOSFATO NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO
NaOH	HIDRÓXIDO DE SÓDIO
NH ₄ ⁺	AMÔNIO
NNP	NITRATE-NITRITE PORTER FAMILY
NO ₃ ⁻	NITRATO
NTR	NITRATE TRANSPORTER
OPA	O-FTALDIALDEÍDO
PAR	PHOTOSYNTHETICALLY ACTIVE RADIATION
pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
PTR	PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY
RN	REDUTASE DE NITRATO
RNi	REDUTASE DE NITRITO
SD	STANDARD DERIVATION
SER	SERINA
SO ₄ ²⁻	ÂNION DE ENXOFRE
TRIS	TRISAMINOMETANO
UFC	UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UV	ULTRAVIOLETA
V _{MÁX}	VELOCIDADE MÁXIMA
ZnSO ₄	SULFATO DE ZINCO

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	15
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	A Cultura do Feijão-Caupí	16
2.2	Salinidade no crescimento de plantas cultivadas	17
2.3	Mecanismos de absorção de nitrato em plantas	18
2.4	Processo de assimilação de nitrogênio	19
2.5	Controle endógeno da absorção de nitrato: Atuação dos aminoácidos como mecanismos de sinalização.....	21
2.6	Referências	23
3.	HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	30
3.1	Hipótese.....	30
3.2	Objetivo Geral	30
3.3	Objetivos Específicos	30
	CAPÍTULO I.....	31
4.1.	Introdução.....	32
4.2.	Materiais e Métodos	34
4.3.	Resultados e Discussão.....	39
4.4.	Conclusão	46
4.5.	Referências	47
	CAPÍTULO II.....	52
5.1	Introdução.....	53
5.2	Materiais e Métodos	55
5.3	Resultados e Discussão.....	59
5.4.	Conclusões.....	64
5.5.	Referências	65
	CAPÍTULO III	68
	Abstract.....	69
	Introduction	69
	Material and methods	71
	Plant Material	71
	Time course measurement of net NO ₃ ⁻ influx	71
	Na ⁺ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ and Total Free Amino acid concentrations.....	72
	Amino acids Separation by HPLC	73
	Statistical Analysis	73
	Results	73
	Discussion.....	78

Conclusion.....	82
References	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

O nitrogênio (N) é um dos principais elementos exigidos pelas plantas por possuir um papel vital e exclusivo no metabolismo vegetal. Uma vez presente nos tecidos vegetais, o N pode atuar diretamente na composição de proteínas, ácidos nucleicos, na molécula de clorofila, fosfatídeos, alcalóides e de enzimas (MENGEL *et al.*, 2001). Os íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) são as principais fontes de nitrogênio para as plantas, sendo que a absorção através do NO_3^- é a mais predominante em solos aeróbicos, sendo ele assim, a principal forma de N utilizada pelas culturas agrícolas (JAIWAL *et al.*, 2008)

Em proporções semelhantes das duas formas em meio de cultivo, observa-se uma maior absorção de amônio, comparativamente com a de nitrato, isso ocorre provavelmente pelo fato do NH_4^+ ser um cátion, e assim é absorvido por meio de canal iônico, sem gasto energético, enquanto a absorção de nitrato, usualmente, requer uma quantidade apreciável de energia para ser absorvida pelos transportadores (PRADO, 2008). O processo de absorção de NO_3^- é realizado pelos transportadores da família NTR (Nitrate Transporter) através do processo de co-transporte, retirando íons H^+ da solução, mantendo a neutralidade eletroquímica interna do citoplasma (PRADO, 2008).

Em regiões semiáridas, uma grande porção dos solos é afetada pelo excesso de sais comprometendo o crescimento e desenvolvimento das culturas agrícolas. A salinidade é um dos principais fatores ambientais responsáveis pela redução da absorção do nitrato no solo, regulando este processo por mecanismos diretos e/ou indiretos. Diversos estudos realizados evidenciam os efeitos diretos provocados pela salinidade na regulação da absorção de NO_3^- em plantas, onde os autores atribuem este efeito, principalmente, ao potencial osmótico, composição e natureza do sal (OURRY *et al.*, 1992; ARAGÃO, 2008). Porém, pouco se conhece sobre os efeitos indiretos na regulação do influxo de NO_3^- induzidos pela salinidade, principalmente, através de um mecanismo de *feedback* negativo.

Os efeitos indiretos provocados pela salinidade na regulação do influxo de nitrato através de um *feedback* negativo estão envolvidos principalmente com a regulação do equilíbrio entre o crescimento da planta e a absorção de nitrato em condições de estresse salino (SILVEIRA *et al.*, 2012). Resultados de trabalhos mostram que em condições de salinidade, ocorre um desbalanço entre a assimilação de amônia e síntese de proteínas, induzindo a um aumento significativo do conteúdo de aminoácidos livres, tanto na raiz quanto na parte aérea. Este aumento no conteúdo de aminoácidos livres está associado diretamente

com a baixa demanda de N para o crescimento das plantas, causando assim, o controle negativo do influxo de nitrato (FOYER e NOCTOR, 2004).

Os processos que promovem o mecanismo de *feedback* negativo no influxo de nitrato provocado pela baixa demanda de N na planta são aceitos pelos fisiologistas como um mecanismo de sinalização para a modulação da absorção de nitrato transmitido para as raízes, porém o principal responsável por este processo ainda é desconhecido.

Os aminoácidos livres são moléculas sinalizadoras que regulam a absorção de nitrato por atuarem como indicadoras do estado de nitrogênio da planta. No caso da glutamina, alguns ensaios mostram que sua aplicação na forma exógena modula negativamente, tanto o influxo, quanto a expressão dos transportadores de nitrato (THORNTON, 2004). Alguns trabalhos realizados avaliando o efeito da glutamina na atividade da enzima redutase de nitrato têm verificado que a glutamina afeta negativamente a expressão desta enzima (FAN *et al.*, 2006). Mesmo com estas informações, ainda existem poucos trabalhos que evidenciam os mecanismos subjacentes relacionados na redução do crescimento das plantas induzida por sal, relacionando-os com o influxo de nitrato por um mecanismo de *feedback* negativo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Cultura do Feijão-Caupí

O feijão-caupí é uma cultura de origem africana, a qual foi introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses no Estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988). O feijão-caupí é uma planta Dicotiledônea, da ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, secção *Catyang*, espécie [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e subespécie *unguiculata*, subdividida em quatro cultigrupos *Unguiculata*, *Sesquipedalis*, *Biflora* e *Textilis* (MARÉCHAL *et al.*, 1978; SMARTT, 1990).

No Brasil são cultivadas várias espécies de feijão; entretanto, para efeito de regulamento técnico, somente as espécies *Phaseolus vulgaris* (L.) e [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], feijão comum e feijão-caupí, respectivamente, são consideradas como feijão pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008). Essas duas espécies são socioeconomicamente as mais importantes no país. A produção de feijão-caupí concentra-se nas regiões Nordeste e Norte e está se expandindo para a região Centro-Oeste, principalmente para o estado do Mato Grosso.

Na região Nordeste, a produção tradicionalmente concentra-se nas áreas semiáridas, onde outras culturas leguminosas anuais, em razão da irregularidade das chuvas e das altas temperaturas, não se desenvolvem satisfatoriamente. A produção de feijão-caupí nas regiões Nordeste e Norte é feita principalmente por agricultores familiares que ainda utilizam práticas tradicionais.

O feijão-caupí tem grande importância, tanto como alimento quanto como gerador de emprego e renda. Portanto, o entendimento básico de suas características fisiológicas e nutricionais se faz necessário para uma tentativa de aumento de produção, principalmente em condições edafoclimáticas adversas, como as condições encontradas na região nordeste.

2.2 Salinidade no crescimento de plantas cultivadas

A salinidade é definida como o excesso de íons inorgânicos no solo ou no meio de cultivo das plantas. Por se tratar de um estresse abiótico, ela representa um dos principais problemas da agricultura mundial e um dos principais fatores que limitam o crescimento e a produtividade das culturas (ALLAKHVERDIEV *et al.*, 2000).

O processo natural de salinização envolve o acúmulo de íons, principalmente, Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} e HCO_3^- , nas camadas cultiváveis do solo (OLIVEIRA, 1997). No caso dos solos sódicos, o excesso do Na^+ provoca alterações nas propriedades físicas do solo, reduzindo a floculação das argilas e a estabilidade dos agregados, provocando como consequências, reduções na porosidade e capacidade de retenção de água (LIMA, 1997).

As raízes da plantas desempenham uma série de funções importantes durante o crescimento e desenvolvimento e é a primeira parte da planta a ser afetada pela salinidade do solo (MIŠIĆ *et al.*, 2012). O solo contém normalmente uma concentração diluída de sais, porém quando em excesso, a presença dos sais provoca reduções no potencial osmótico da solução do solo, induzindo a um decréscimo da energia livre da água, trazendo como consequência, uma diminuição do influxo de água pelas raízes e do fluxo transpiratório das plantas (SALISBURY e ROSS, 1992).

No nível bioquímico, ainda não existe, na literatura, um modelo teórico capaz de explicar a rápida modulação exercida pelo excesso de sais (no meio radicular) sobre o crescimento. É possível que esta resposta envolva uma cadeia de sinalização molecular (modula dores e proteínas), ativação e expressão de genes ligados às proteínas do ciclo celular (ciclinas), modulando a síntese protéica e a divisão celular, com participação de hormônios. Portanto, a modulação no crescimento, exercida pela salinidade moderada, deve-se a uma

nova homeostase ditada por menores taxas de crescimento associadas, principalmente, como menor fotossíntese. Nessa fase, as reações bioquímicas funcionam normalmente, porém com menores velocidades (SILVEIRA *et al.*, 2010a).

A maioria dos estudos envolvendo salinidade e a absorção de nitrato é relativa à absorção líquida e os estudos que analisam simultaneamente os efeitos da salinidade sobre cada um dos componentes são escassos ou inexistentes. Várias evidências mostram que a salinidade afeta fortemente influxo de nitrato (PEUKE e JESCHKE, 1999; MASSA *et al.*, 2009). Em condições de campo a salinidade é constituída por uma mistura de íons salinos, que pode variar amplamente na sua composição química (RODRIGUES *et al.*, 2013). Assim, a natureza química dos componentes da salinidade, ânions e cátions, pode afetar direta ou indiretamente na absorção de NO_3^- por competição iônica, sinergismo, força iônica ou por alteração no potencial de membrana (CACHORRO *et al.*, 1994; MASSA *et al.*, 2009).

O estresse salino pode modificar diversos processos metabólicos vegetais por meio de mecanismos celulares de tradução de sinais. Por exemplo, a biossíntese de ácido abscísico nas raízes e a mobilização deste hormônio para as folhas (BOHNERT *et al.*, 1995; INGRAN e BERTELI, 1996; MELO, 1999). Além disso, outros processos metabólicos são afetados negativamente pela salinidade (NETONDO *et al.*, 2004a, 2004b; PRAXEDES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011). No caso do metabolismo de nitrogênio, BERTELI *et al.* (1995) e COSTA (1999), sugerem que sob condições de estresse, as atividades da GS (glutamina sintetase) e GOGAT (Glutamato sintase) podem aumentar devido ao incremento na atividade das proteases e catabolismo de aminoácidos (senescência induzida por salinidade), induzindo o aumento do acúmulo de amônio, glutamina e glutamato livres. Nestas condições as atividades das enzimas de reassimilação de amônio devem aumentar na planta.

2.3 Mecanismos de absorção de nitrato em plantas

É difícil encontrar um ambiente em que o N não seja um fator limitante de crescimento das culturas, isto é demonstrado pelo fato de que a adição de fertilizantes nitrogenados estimula o crescimento das culturas (MILLER *et al.*, 2007). O íon nitrato (NO_3^-) representa a principal fonte de N inorgânico disponível para as culturas cultivadas em solos aerados (REDINBAUGH e CAMPBELL, 1991). As principais fontes de NO_3^- são provenientes da mineralização do N-orgânico, através dos processos de amonificação e nitrificação. Em solos com predomínio de cargas negativas, o NO_3^- é facilmente lixiviado ao longo do perfil do solo, ficando fora do alcance da zona de absorção das raízes, tornando a

solução do solo, pobre em NO_3^- e prejudicando assim o crescimento das plantas (SILVEIRA e CROCOMO, 1985; PILBEAN e KIRKBY, 1990; MELO, 1999).

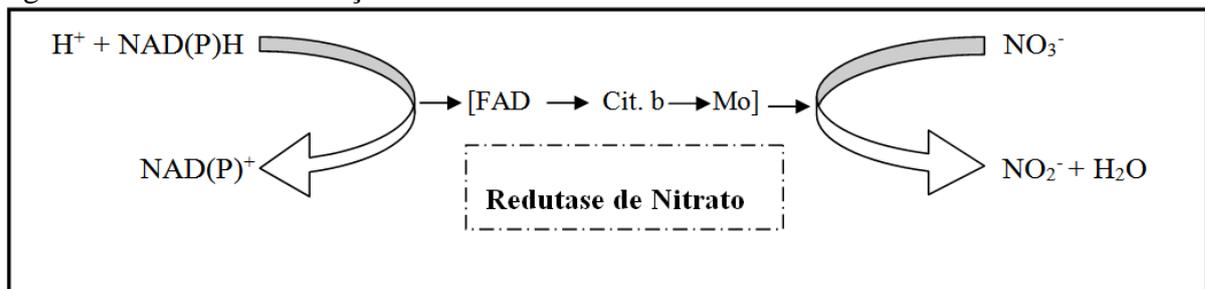
A absorção de nitrato é a resultante do balanço de influxo e efluxo, pois são dois processos de direções opostas e ocorrem no plasmalema, intermediado por um potencial eletroquímico. Neste contexto, o influxo determina as taxas máximas de absorção e o efluxo determina o equilíbrio da absorção líquida (DEANNE-DRUMMOND, 1990). O processo de absorção do NO_3^- ocorre por meio de canais iônicos via simporte na proporção (em mol) de 1 NO_3^- para 2 H^+ , dirigido pelo gradiente de prótons (H^+) gerado pela H^+ ATP-ase da membrana (FORDE, 2000).

Existem duas famílias de proteínas que estão envolvidas diretamente com a absorção e transporte ativo de nitrato: a PTR (Peptide Transporter Family) e NNP (Nitrate-Nitrite Porter Family) (WILLIAMS e MILLER, 2001). A família PTR é constituída por proteínas expressadas por genes da família NTR1 e estão envolvidas na absorção de NO_3^- , aminoácidos, peptídeos, entre outros compostos nitrogenados. A família NNP, por sua vez, inclui proteínas transportadoras de NO_3^- e NO_2^- , que são codificados pela família NTR2 (FORDE, 2000; SOUSA, 2011).

2.4 Processo de assimilação de nitrogênio

Depois de absorvido, o nitrato entra na rota da enzima redutase de nitrato (RN). Esta enzima promove a redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), utilizando geralmente NADH ou NADPH, como um redutor (OAKS, 1994; YANEVA *et al.*, 2000), conforme esquematizado na figura 1.

Figura 1 - Processo de redução do nitrato através da enzima RN.



Fonte: Silveira *et al.*, 2010b.

A RN é uma enzima que está localizada principalmente nas células do mesofilo foliar e no citosol de células da epiderme e córtex radicular (STÖHR e ULLRICH, 2002). Sua

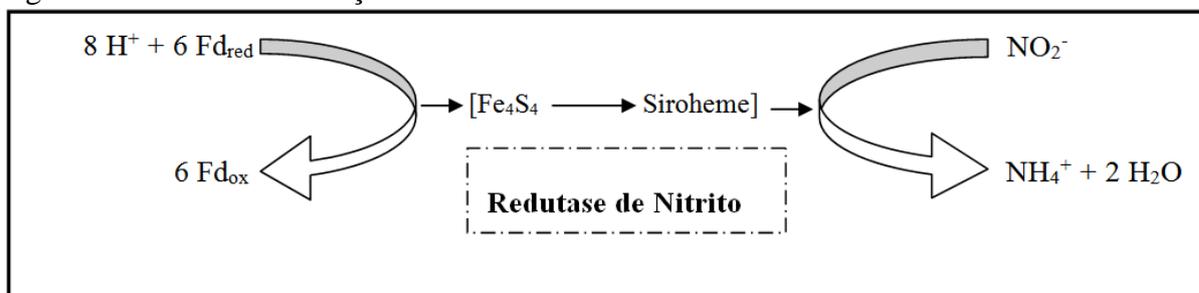
regulação é bastante estudada, tendo foco de estudos os indicadores imunoquímicos e biomoleculares, a partir daí são estabelecidas informações seguras sobre as relações de indução, inibição, ativação e degradação da enzima RN (LEA, 1997; MELO, 1999; VIÉGAS e SILVEIRA, 2002; FAN *et al.*, 2006; XIONG *et al.*, 2012; GARG, 2013).

O nitrato é o principal regulador da taxa de indução e degradação da RN (KAISER e HUBER, 1994). Na presença de nitrato há um grande aumento na atividade e concentração desta enzima (LEA, 1997; SOUSA, 2011). Ao contrário, quando há repentinamente a ausência de nitrato em solução, a RN é rapidamente degradada por uma protease específica (SOLOMONSON e BARBER, 1990).

Diversos fatores internos (produtos da fotossíntese, *pool* de aminoácidos, hormônios, carga energética da célula, poder redutor, fluxo interno de nitrato) e os externos (luz, temperatura, disponibilidade e concentração de nitrato) podem interferir em um ou mais eventos determinantes da concentração da enzima na forma ativa no tecido, afetando a atividade da redutase de nitrato (CRAWFORD, 1995). Conforme estudos anteriores, as concentrações internas de nitrato, glutamina livre e sua proporção em relação ao glutamato disponível são provavelmente os metabólitos chaves que governam a capacidade de redução do nitrato na planta (SOLOMONSON e BARBER, 1990; CRAWFORD, 1995).

Após a redução do nitrato a nitrito, a planta necessita realizar rapidamente o transporte deste íon do citosol para o interior dos cloroplastos nas folhas e para os plastídios das raízes. Nestas organelas o nitrito se reduz a amônio através da enzima redutase de nitrito, seguindo o seguinte esquema ilustrado na figura 2.

Figura 2 - Processo de redução do nitrito através da RNi.

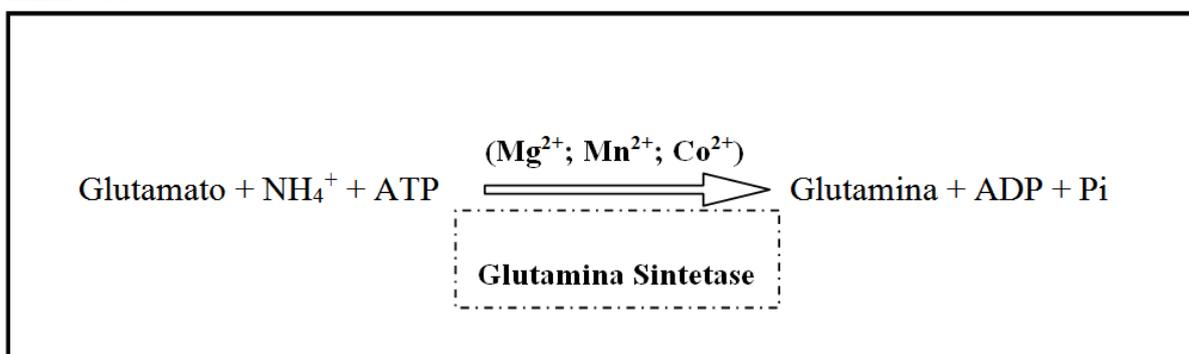


Fonte: Silveira *et al.*, 2010b.

Após a conversão do nitrito a amônio, entra então em atividade uma enzima denominada glutamina sintetase (GS), uma das enzimas responsáveis pela síntese de glutamina, utilizando amônio como substrato. (LAM *et al.*, 1996). Outra enzima que

desempenha este papel é a glutamato desidrogenase (GDH), a qual era considerada até alguns anos atrás, a principal rota de assimilação de amônio. Porém, alguns estudos comprovaram que esta enzima possui uma afinidade para o amônio, cerca de dez vezes menor que a glutamina sintetase (BRUGGEMAN *et al.*, 2005), sendo assim, a via GS é considerada a principal via de assimilação de amônio (BERNARD *et al.*, 2009). A GS catalisa a conversão do glutamato (Glu) em glutamina (Gln), utilizando amônio, energia em forma de ATP, e um cátion bivalente como cofator, conforme apresentado abaixo (Figura 3).

Figura 3 - Processo de incorporação do amônio para formação de aminoácido através da enzima GS.



Fonte: Silveira *et al.*, 2010b.

2.5 Controle endógeno da absorção de nitrato: Atuação dos aminoácidos como mecanismos de sinalização

Os processos de regulação da absorção e assimilação de nitrogênio são identificados pelas plantas por um mecanismo de *feedback*. Este mecanismo se baseia no fato de que o *pool* interno de metabólitos nitrogenados tais como, os aminoácidos podem indicar o estado de N da planta, fornecendo um sinal que pode regular a absorção e a assimilação de N pelas plantas (MILLER *et al.*, 2007). Diferentes compostos nitrogenados podem ser considerados sinalizadores do estado de N na planta, sendo eles, nitrato, aminoácidos, proteínas. Dentre estes, alguns compostos têm sido sugeridos como favoritos: o próprio nitrato, no tecido tem sido proposto pelos bioquímicos como um sinalizador para regular o crescimento das plantas, incluindo o crescimento radicular (MILLER *et al.*, 2007).

O modelo de *feedback* tem sido aceito pelos biólogos de plantas, porém sua exata localização, natureza e seus mecanismos ainda não são bem conhecidos. As proteínas também têm sido atribuídas como modelos indicadoras do estado de N nas plantas, principalmente

envolvendo-se no crescimento radicular (ANDREWS *et al.*, 2006). Alguns experimentos testaram a regulação por mecanismo de *feedback* utilizando aminoácidos, mostrando que o tratamento das plantas com aminoácidos exógenos têm inibido a absorção e assimilação de N, alterando a expressão de transportadores de NO_3^- (VIDMAR *et al.*, 2000; GLASS *et al.*, 2002). Vários aminoácidos têm sido utilizados, sendo aplicados diretamente em elevadas concentrações, com o objetivo de alterar o *pool* de aminoácidos nas células. Dentre os diversos aminoácidos testados, o que se mostrou mais eficaz foi à glutamina, promovendo elevadas modificações no influxo e ao nível de transcrição (VIDMAR *et al.*, 2000; GLASS *et al.*, 2002).

Uma abordagem experimental utilizada para compreender o papel das enzimas nestes ensaios é a utilização de inibidores químicos. No caso da assimilação de N, a utilização da metionina sulfoximina (MSO), inibidora da atividade da enzima glutamina sintetase (GS), a qual realiza a conversão de NH_4^+ a glutamina. Em plantas superiores estudos detalhados já foram realizados para avaliar quantitativamente o teor de amônia assimilada através da via GS/GOGAT (FENTEM *et al.*, 1983; MAUGHAN e COBBETT, 2003). A azaserina (AZA) é um inibidor irreversível de uma grande variedade de enzimas que catalisam reações de transferência de glutamina em plantas incluindo a glutamato sintase (EC 2.6.1.53). O composto não tem ação na planta glutamato desidrogenase ou glutamina sintetase. Estudos anteriores mostraram que a azaserina causou um aumento no teor de glutamina, uma diminuição rápida no glutamato, e um pequeno aumento no conteúdo de amônia em plantas de *Lemna minor* L. e *Hordeum vulgare* L. (STEWART e RHODES, 1976; FENTEM *et al.*, 1983).

Além da glutamina, outros aminoácidos como o glutamato, cisteína e asparagina têm sido citados como reguladores da absorção de nitrato (STITT *et al.*, 2002), no entanto, a maioria dos trabalhos tem destacado a glutamina como principal candidata, demonstrando de forma direta resultados sobre seus efeitos quando aplicada de forma exógena (via raiz) ou direto na seiva do floema, modulando negativamente tanto o influxo, quanto a expressão dos transportadores de nitrato (PAL'OVE-BALANG e MISTRÍK, 2002; THORNTON, 2004; FAN *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2012) .

2.6 Referências

ARAGÃO, R. M. de. **Mecanismos cinéticos de inibição da absorção de nitrato em raízes de feijão caupí expostas à salinidade**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ALLAKHVERDIEV, S. I.; SAKAMOTO, A.; NISHIY AMAMA, Y.; INABA, M.; MURATA, N. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosynthesis I and II in *Synechococcus* sp. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1047-1056, 2000.

ANDREWS, M.; RAVEN, J.; LEA, P. J.; SPRENT, J. A role for shoot protein in shoot-root dry matter allocation in higher plants. **Annals of Botany**, v. 97, p. 3-10, 2006.

BERNARD, S. M.; HABASH, D. Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**, v. 182, p.608-620, 2009.

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

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stress. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1109-1111, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12 de 28 mar. 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 31 mar. 2008. Seção 1, p. 11-14.

BRUGGEMAN, F. J.; BOOGERD, F. C.; WESTERHOFF, H. V. The multifarious short-term regulation of ammonium assimilation of *Escherichia coli*: dissection using an in silico replica. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 1965-1985, 2005.

CACHORRO, P.; ORTIZ, A.; CERDÁ, A. Implications of calcium nutrition on the response of *Phaseolus vulgaris* L. to salinity. **Plant and Soil**, v.159, p.205-212, 1994.

COSTA, R. C. L. **Assimilação de nitrogênio e ajustamento osmótico em plantas noduladas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (Walp) L.] submetidas ao estresse hídrico.** 1999. 255 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

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

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, p.1-37, 1990.

FAN, X.; GORDON-WEEKS, R.; SHEN, Q.; MILLER, A. J. Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p.1333-1340, 2006.

FENTEM, P. A.; LEA, P. J.; STEWART, G. R. Action of Inhibitors of Ammonia Assimilation on Amino Acid Metabolism in *Hordeum vulgare* L. (cv Golden Promise). **Plant Physiology**, v.71, p.502-506, 1983.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupí. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). **O caupí no Brasil.** Brasília, DF: IITA: EMBRAPA, 1988. p. 26-46.

FOYER, C.; NOCTOR, G. Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism. **Kluwer Academic Publishers**, New York, 2004.

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

GARG, S. K. Role and Hormonal Regulation of Nitrate Reductase Activity in Higher Plants: A Review. **Plant Sciences Feed**, v.3, p.13-20, 2013.

GLASS, A. D. M.; BRITTO, D. T.; KAYSER, B. N.; KINGHORN, J. R.; KRONZUCKER, H. J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M. Y.; UNKLES, S. E.; VIDMAR, J. J. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.855-864, 2002.

INGRAN, J.; BERTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.47, p.377- 403, 1996.

JAIWAL, P.; SINGH, R.; DHANKHER, O. P. **Plant Membrane and Vacuolar Transporters**. 1st edition. CABI, 2008. 400 p.

KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiology**. v. 106, p. 817-821, 1994.

LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T.; OLIVEIRA, I. C.; OLIVEIRA, R. M.; CORUZZI, G. M. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p.569-593, 1996.

LEA, P. J. Primary Nitrogen Metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (eds) **Plant Biochemistry**, Academic Press, San Diego, California, 1997. p. 273-313.

LIMA, L. A. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 1997, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande, 1997. 35p.

MARÉCHAL, R.; MASCHERPA, J. M.; STAINIER, F. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres Phaseolus et Vigna (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. **Boissiera**, Geneve, v. 28, p. 1-273, 1978.

MASSA, D.; MATTSON, N. S.; LIETH, H. Effects of saline root environment (NaCl) on nitrate and potassium uptake kinetics for rose plants: a Michaelis-Menten modeling approach. **Plant and Soil**, v.318, p.101-115, 2009.

MAUGHAN, S. C.; COBBETT, C. S. Methionine sulfoximine, an alternative selection for the *bar* marker in plants. **Journal of Biotechnology**, v.102, p.125-128, 2003.

MELO, A. R. B. **Utilização de nitrato no ajustamento osmótico de plantas de feijão de corda submetida a diferentes níveis de salinidade**. 1999. 164 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

MENGUEL, K.; KIRKBY, E. A.; KOSEGARTEN, H.; APPEL, T. **Principles of Plant Nutrition**. 5th ed. Netherlands: Springer, 2001. 849 p.

MILLER, A. J.; FAN, X.; SHEN, Q.; SMITH, S. J. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 111-119, 2007.

MIŠIĆ, D.; ŠILER, B.; ŽIVKOVIĆ, J. N.; SIMONOVIĆ, A.; MAKSIMOVIĆ, V.; BUDIMIR, S.; JANOŠEVIĆ, D.; ĐURIČOVIĆ, M.; NIKOLIĆ, M. Contribution of inorganic cations and organic compounds to osmotic adjustment in root cultures of two *Centaureum* species differing in tolerance to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.108, p. 389-400, 2012.

NETONDO, G. W.; ONYANGO, J. C.; BECK, E. Sorghum and salinity: I. Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. **Crop Science**, v.44, p.797-805, 2004a.

NETONDO, G. W.; ONYANGO, J. C.; BECK, E. Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. **Crop Science**, v.44, p.806-811, 2004b.

OAKS, A. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 739-750, 1994.

OLIVEIRA, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. 1997. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 1997, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande, 1997. 35p.

OURRY, A.; MESLÉ, S.; BOUCAUD, J. Effect of osmotic stress (NaCl and polyethelene glycol) on nitrate uptake, translocation, storage and reduction in ryegrass (*Lolium perenne* L.) **New Phytologist**, v.120, p.275-280, 1992.

PAL'OVE-BALANG, P.; MISTRÍK, I. Control of nitrate uptake by phloem-translocated glutamine in *Zea mays* L. seedlings. **Plant Biology**, v.4, p.440-445, 2002.

PEUKE, A. D., JESCHKE, W. D. The characterization of inhibition of net nitrate uptake by salt in salt-tolerant barley (*Hordeum vulgare* L. cv. California Mauriot). **Journal of Experimental Botany**, v.50 (337), p.1365-1372, 1999.

PRADO, R. M. **Nutrição de Plantas**. 1ª Ed. Botucatu: UNESP, 2008. 408p.

PRAXEDES, S. C.; LACERDA, C. F. de; DAMATTA, F. M.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Salt tolerance is associated with differences in ion accumulation, biomass allocation and photosynthesis in cowpea cultivars. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.196, p.193-204, 2010.

PILBEAN, D. J.; KIRKBY, E. A. The plant physiology of nitrate uptake. In: ABROL, Y. P (eds). **Nitrogen in higher plants**, 1990. p.39-64.

REDINBAUGH, M. G.; CAMPBELL, W. H. Higher plant responses to environmental nitrate. **Plant Physiology**, v. 82, p. 640-650, 1991.

RODRIGUES, C. R. F.; SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. High K^+ supply avoids Na^+ toxicity and improves photosynthesis by allowing favorable $K^+:Na^+$ ratios through the inhibition of Na^+ uptake and transport to the shoots of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, p.157-164, 2013.

SALISBURY, F. B; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4ª Ed. California: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682 p.

SILVA, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. **Scientia Agricola**, v.68, p.62-68, 2011.

SILVEIRA, J. A. G.; FERREIRA-SILVA, S. L.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (eds). **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza, CE: INCT Sal, 2010a. p. 161-185.

SILVEIRA, J. A. G.; MARTINS, M. O.; LIMA, A. B.; FERREIRA-SILVA, S. L. Redução de nitrato e assimilação de amônia em sistemas vegetais: mensuração de atividade enzimática e metabólitos. In: FIGUEREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SILVA SANTOS, C. E. R.; STAMFORD, N. P. (eds). **Biotecnologia Aplicada à Agricultura**. Textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília, DF: EMBRAPA:IPA, 2010b. p. 93-123.

SILVEIRA, J. A. G.; CROCOMO, O. J. Assimilação de nitrogênio: Implicações energéticas. In: III SEMINÁRIO DE BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA, 1985, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: USP-ESALQ/CEBTEC/FEALQ, 1985. p.265-295.

SILVEIRA, J. A. G.; MELO, A. R. B.; MARTINS, M. O.; FERREIRA-SILVA, S. L.; ARAGÃO, R. M.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Salinity affects indirectly nitrate acquisition associated with glutamine accumulation in cowpea roots. **Biologia Plantarum**, v.56 (3), p.575-580, 2012.

SMARTT, J. **Grain legumes: evolution and genetic resources**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 333 p.

SOLOMONSON, L. P.; BARBER, M. J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 187-223, 1990.

SOUSA, R. H. V. **Efeito indireto da salinidade na aquisição de nitrato em feijão caupí**. 2011. 62 f. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

STEWART, G. R.; RHODES, D. Evidence for the assimilation of ammonia via the glutamine pathway in nitrate-grown *Lemna minor* L. **Febs Letters**, v.64, p.296-299, 1976.

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

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

THORNTON, B. Inhibition of nitrate influx by glutamine in *Lolium perenne* depends upon the contribution of the HATS to the total influx. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p.761-769, 2004.

VIDMAR, J. J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, Y.; SCHOJOERRING, J. K.; TOURAINÉ, B.; GLASS, A. D. M. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. **Plant Physiology**, v. 123, p.307-318, 2000.

VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Activation of nitrate reductase of cashew leaf by exogenous nitrite. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, p.39-44, 2002.

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.

XIONG, J.; GUANFU, F.; YANG, Y. ZHU, C.; TAO, L. Tungstate: is it really a specific nitrate reductase inhibitor in plant nitric oxide research? **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.33-41, 2012.

YANEVA, I. A.; BAYDANOVA, V. D.; VUNKOVA-RADEVA, R. V. Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 495-501, 2000.

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A salinidade restringe o crescimento das plantas e promove um aumento no conteúdo de aminoácidos livres, principalmente a glutamina, que atua como sinalizador na regulação do influxo de NO_3^- , por um *feedback* negativo.

3.2 Objetivo Geral

Elucidar o papel da glutamina como sinalizador da modulação na absorção de nitrato, em condições de salinidade, por meio de um mecanismo de *feedback* negativo em raízes de feijão-caupí.

3.3 Objetivos Específicos

- Verificar se a aplicação de glutamina exógena apresenta a capacidade de regular negativamente a absorção de nitrato pelas raízes de caupí.
- Utilizar inibidores das enzimas da via GS/GOGAT a fim de confirmar quais dos compostos nitrogenados estão intimamente relacionados com o mecanismo de *feedback* negativo, regulando a aquisição de nitrato pelas raízes.
- Verificar o papel da glutamina como sinalizador da aquisição de nitrato em plantas por um mecanismo de *feedback* induzido por sal.

Com o intuito de atender os objetivos supracitados e contribuir com os testes da hipótese levantada, o presente trabalho foi realizado a partir de três estudos isolados e sequenciais, sendo apresentado cada estudo na forma de capítulo. A descrição detalhada de cada experimento se encontra no item “materiais e métodos” dos respectivos capítulos.

CAPÍTULO I

REGULAÇÃO DO INFLUXO DE NITRATO EM RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPI EM RESPOSTA A APLICAÇÃO DE GLUTAMINA EXÓGENA

4.1. Introdução

A principal fonte de N absorvido pela maioria das espécies de plantas é predominantemente na forma de NO_3^- . Alguns estudos vêm mostrando que o processo de absorção de nitrato ocorre por três sistemas de transporte, sendo eles: o Sistema de Transporte Constitutivo de Alta Afinidade (cHATS), caracterizado por valores baixos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$; o Sistema de Transporte Induzido de Alta Afinidade (iHATS), apresentando valores mais elevados de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ que o cHATS; e por fim o Sistema de Transporte Constitutivo de Baixa Afinidade (LATS). Os Sistemas de Transporte de Alta Afinidade respondem pela absorção de NO_3^- , quando o mesmo se encontra em baixas concentrações (1 μM a 1 mM de NO_3^-), e o Sistema de Transporte de Baixa Afinidade responde pela absorção de NO_3^- em concentrações acima de 1 mM de NO_3^- , sendo saturável em concentrações acima de 50 mM de NO_3^- (ASLAM *et al.*, 1992; VON WIRÉN *et al.*, 2000; ARAGÃO, 2008).

Alguns ensaios experimentais têm demonstrado que a absorção radicular do NO_3^- pode ser regulada por diversos fatores, dentre eles, o próprio nitrato e os produtos do seu metabolismo como o amônio e os aminoácidos (GLASS e SIDDIQI, 1995). Outros trabalhos têm sugerido que o *pool* de aminoácidos livres no tecido e sua ciclagem entre raiz e parte aérea podem atuar como indicador do estado de N nas plantas, desempenhando um papel de sinalizador na regulação da absorção e da assimilação de N (ASLAM *et al.*, 2001; FAN *et al.*, 2006). A concentração de aminoácidos na solução do solo varia em uma faixa de aproximadamente 0,1 a 60 μM e constitui 10-40 % do N solúvel (JONES *et al.*, 2002; HILL *et al.*, 2011). Quando estes aminoácidos são aplicados de forma exógena em raízes, a maioria das plantas desencadeia um mecanismo que resulta em uma inibição da absorção de NO_3^- (LEE *et al.*, 1992; GESSLER *et al.*, 1998; RAWAT *et al.*, 1999), mas a natureza e os mecanismos relacionados com este processo de feedback ainda permanecem desconhecidos até os dias atuais.

Alguns estudos têm demonstrado que tanto o influxo quanto a abundância do nível de transcritos dos transportadores de NO_3^- apresentaram diminuição simultânea em tecidos de raízes tratadas com a aplicação exógena de aminoácidos (VIDMAR *et al.*, 2000). Outros resultados mostram que a expressão de transportadores de NO_3^- de alta afinidade (induzidos) têm se mostrado aumentada em mutantes de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana glauca* com baixa atividade da RN, o que sugere que a sua regulação ocorre devido às formas reduzidas de N, em vez do próprio NO_3^- (KRAPP *et al.*, 1998; LEJAY *et al.*, 1999).

Dentre os diversos aminoácidos presentes no tecido das plantas, a glutamina tem sido citada por atuar efetivamente na inibição da expressão dos transportadores de nitrato de alta afinidade *NpNTR2.1* (QUESADA *et al.*, 1997; KRAPP *et al.*, 1998) e *HvNTR2* (VIDMAR *et al.*, 2000). Além do processo de absorção, o *pool* de aminoácidos pode atuar inibindo as enzimas responsáveis pela assimilação de N nas plantas. Sivasankar *et al.* (1997) observaram que tanto a glutamina como a asparagina inibiram a indução da atividade da enzima RN em raízes de milho, tanto em baixa quanto em alta concentração de nitrato. Apesar da glutamina livre está envolvida na modulação negativa da expressão do gene da RN (FAN *et al.*, 2006), o seu envolvimento na regulação da absorção de nitrato ainda não é confirmada, embora vários trabalhos tenham sugerido sua participação (SILVEIRA *et al.*, 2012). Estudos envolvendo a regulação metabólica relacionada ao metabolismo de nitrogênio por *feedback* ainda são muito escassos.

Além da existência de algumas dificuldades na comparação em estudos com diferentes espécies de plantas, é difícil generalizar informações sobre o efeito que os aminoácidos causam na regulação do influxo de NO_3^- . Enquanto alguns efeitos dos aminoácidos nos transportadores são conhecidos, existem poucas informações sobre o efeito dos aminoácidos nos vários sistemas de transporte que contribuem para a aquisição total de nitrato nas plantas.

Pergunta

A aplicação de glutamina exógena tem a capacidade de promover o aumento do conteúdo de aminoácidos livres no tecido das raízes de caupí? E este aumento, promove uma redução do influxo de nitrato?

4.2. Materiais e Métodos

Material vegetal

Em todas as fases experimentais foram utilizadas sementes previamente selecionadas de feijão-caupí [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cv. Pitiúba. As sementes foram germinadas em papel *germtest*, em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade. Inicialmente, procedeu-se a desinfecção das sementes com NaClO 0,2 % (m/v), agitadas por 5 minutos e posteriormente lavadas por 3 vezes com água destilada e embebidas em água deionizada por uma hora. Após o período de embebição, dez sementes foram distribuídas em folha de papel *germtest* (280 x 380 mm), previamente umedecidas com água destilada, na proporção de 2,5 vezes em relação à massa do papel e ao final cobertas com outra folha também previamente umedecida e formando assim, um rolo. Ao final, foram formados três rolos, contendo 10 sementes cada. Os rolos foram cobertos com sacos plásticos desinfetados com etanol 70 % (v/v) e acondicionados em câmara de crescimento na posição vertical, onde permaneceram incubados durante um período de quatro dias a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, sob fotoperíodo de 12 h e radiação fotossinteticamente ativa de $240\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$.

A condução deste experimento foi realizada em casa de vegetação, do Laboratório de Metabolismo de Plantas (LABPLANT) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, em Fortaleza-CE, cuja localização é $3^{\circ} 44'$ sul, e longitude $38^{\circ} 33'$ oeste, o clima local é classificado como AW', segundo Köppen. O período experimental foi de Julho de 2013 a Agosto de 2013. As condições ambientais no interior da casa de vegetação foram em média: fotoperíodo de 12 horas, temperaturas de $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ pela manhã e $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a noite e umidade relativa de 55 % pela manhã e 75 % à noite.

Após a etapa de germinação (4 dias), as plântulas foram transferidas para vasos de polietileno com capacidade para 5 litros, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada com a ausência de amônio e diluída a $\frac{1}{2}$ força iônica (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva, seguindo as concentrações propostas por Hoagland e Arnon (1950) e diluída a ½ força iônica.

Macronutrientes	Concentração (mM)
Ca (NO ₃) ₂	2,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄	1
KNO ₃	2,5
Micronutrientes	Concentração (µM)
H ₃ BO ₃	40
MnCl ₂	9
Fe-EDTA	100
Na ₂ MoO ₄	0,1
ZnSO ₄	7
CuSO ₄	3

As plantas permaneceram cultivadas nestas condições por um período de 14 dias, onde as soluções foram trocadas a cada três dias. Após este período de crescimento, as plantas foram submetidas a uma aclimatação sem a presença de nitrato em solução por 4 dias, com o objetivo de esgotar as reservas internas de nitrato no tecido das plantas. Para isso, os sais KNO₃ e CaNO₃, foram substituídos por K₂SO₄ e CaCl₂ para manter constante as concentrações de K⁺ e Ca²⁺ em solução.

Em sequência, as plantas deficientes em nitrato foram levadas ao laboratório, onde as raízes das plantas foram destacadas, com um corte na altura da inserção da raiz no caule, e logo depois foram lavadas por 30 minutos em uma solução de CaCl₂ 1 mM para a eliminação do NO₃⁻ retido no apoplasto. Em seguida, as raízes destacadas foram secadas em papel toalha, pesadas em balança analítica e posteriormente transferidas para erlenmeyers contendo um meio de incubação, constituído por MES 1 mM, TRIS 0,5 mM, CaCl₂ 1 mM, KNO₃ 2 mM, pH 6,0 ± 0,4 e obedecendo a relação média (massa fresca/volume) de 2 g de massa fresca de raiz a cada 25 mL de meio de incubação. Nestas condições, foram aplicados em cada erlenmeyer inicialmente dois tratamentos: controle (sem presença de glutamina) e outro com a aplicação de 10 mM de glutamina exógena. Os tratamentos foram compostos por quatro repetições onde foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado.

As raízes permaneceram incubadas em banho-maria por um período de 100 minutos, avaliando-se o influxo de nitrato a cada 20 minutos, por meio da coleta de uma alíquota de 50 µL da solução de incubação. O volume retirado foi imediatamente repostado com água deionizada. Nesta avaliação, as alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio e diluídas em 450 µL de água deionizada, totalizando 500 µL, onde posteriormente foram quantificadas

as concentrações de nitrato pelo método do ultravioleta (CAWSE, 1967). Nesta determinação foram utilizados 0,5 mL de solução em presença de 2 mL de ácido perclórico 5 % e a leitura foi feita em espectrofotômetro de ultravioleta a 210 nm. As concentrações foram determinadas a partir da curva padrão de KNO_3 p.a. e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g MF}^{-1}$.

Ao final das avaliações do influxo, as raízes foram coletadas, lavadas em CaCl_2 1 mM e separadas em duas partes imediatamente congeladas em N_2 líquido. Posteriormente, uma das partes foi levada ao liofilizador e a outra à câmara de refrigeração (-80°C) para a realização das avaliações químicas e bioquímicas, respectivamente.

A concentração de nitrato no tecido foi realizada a partir do material liofilizado, onde se utilizou 50 mg da amostra para a extração com água deionizada a 100°C por 1 hora. O material foi agitado a 3.000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante foi coletado. Uma alíquota de 0,1 mL de extrato foi misturada a 0,2 mL da solução de ácido salicílico 5% (m/v) e adicionado a 5 mL de NaOH 2 N, e levado para leitura de absorvância em espectrofotômetro a 410 nm (CATALDO, 1975). A concentração foi obtida a partir da curva padrão de KNO_3 e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g MS}^{-1}$ do tecido.

Também foi feita a quantificação do conteúdo de amônio, seguindo a metodologia de (WEATHERBURN, 1967; FELKER, 1977) para acompanhar o acúmulo de NH_4^+ , sendo ele também citado como um provável inibidor da aquisição de nitrato. Para a extração, foi realizado o mesmo procedimento da análise anterior para determinação do nitrato. Do extrato obtido, foi transferida uma alíquota de 0,4 mL para tubos de ensaio contendo 2,5 mL da solução de reação A (5 g de fenol + 25 mg de nitroprussiato de sódio em água deionizada e o volume completado para 500 mL), agitada em vórtex, posteriormente foi adicionada 2,5 mL da solução de reação B (2,5 g de NaOH + 12,6 mL de hipoclorito de sódio comercial e o volume completado para 500 mL) e novamente agitada. Os tubos foram colocados em banho-maria por 20 minutos a 37°C e após 30 minutos em temperatura ambiente foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 625 nm. A concentração de amônio livre foi determinada utilizando-se uma curva padrão ajustada com concentrações crescentes de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g MS}^{-1}$ do tecido.

Para a determinação dos aminoácidos, glutamina, glutamato, aspartato, serina e asparagina as raízes liofilizadas foram maceradas com N_2 líquido e armazenados em solução extratora M:C:W (metanol:clorofórmio:água; 12:5:3; v/v/v) na proporção de 1 mL por 0,5 gramas de massa seca, sob refrigeração. O extrato foi então obtido segundo Bielecki e Turner (1966), com pequenas modificações. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 g durante

10 min., em tubo de micro centrífuga (eppendorf) a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspensão novamente em 1 mL de M:C:W, seguido de nova centrifugação a 14.000 g por 10 min. a 4 °C. Os sobrenadantes foram então reunidos, para obter o extrato total de 2 mL, em M:C:W. A cada 2 mL desse extrato, foi acrescentado 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água ultra pura, filtrada em filtro milli-Q. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 24 horas, para separação de fases (aquosa e metanólica).

A fase superior, aquosa, foi coletada com auxílio de uma pipeta automática e concentrada por evaporação até aproximadamente 1 mL de seu volume em banho-maria a 40 °C por cerca de 24 h, com os objetivos de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes. A separação e análise dos aminoácidos livres foram efetuadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa do tipo Hypersil ODS (C 18), 250 × 4,6 mm e 5 µm, após derivatização com *o*-ftaldialdeído (OPA) conforme (PUIATTI e SODEK, 1999).

A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com os solventes, tampão fosfato para a bomba A (= "A"): [Na₂HPO₄.7H₂O 50 mM, CH₃COONa 50 mM, 1,5 mL de CH₃COOH (pH 7,25), 20 mL de tetrahidrofurano e 20 mL de metanol específico para HPLC em 1 L de volume final] e metanol 65 % para a bomba B (= "B"). Ambas soluções foram desaeradas, sendo o tampão "A" filtrado a vácuo, em filtro Millipore, por meio de membrana LCR em PTFE hidrolisado, com 0,45 µm de poro. O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se, inicialmente, 50 mg de OPA em 1 mL de metanol específico para CLAE, misturando posteriormente a 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 (ácido bórico 2,4 % p/v em H₂O, pH ajustado com NaOH 2 N) e filtrado em seguida em filtro de seringa Millipore com membrana Express em PES, de 0,22 µm. No dia de uso, 20 µL de 2-mercaptoetanol foram adicionados a cada 2,5 mL desta mistura.

Uma alíquota de 100 µL de amostra ou padrão foi misturada com 300 µL do reagente OPA + 2-mercaptoetanol em vials e agitado. Após 2 min. de reação, tempo suficiente para formar os derivados aminoácidos-OPA, as amostras foram levadas ao CLAE. Nesse momento foi iniciada a eluição da mistura em gradiente dos dois tampões, "A" e "B" através da coluna cromatográfica com fluxo de 0,8 mL min.⁻¹, em um gradiente formado por quantidades crescentes de "B" em relação à "A". O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção de "B" em relação à "A" da seguinte forma: 20 % aos 0 min., 28 % aos 5 min., 58 % aos 35 min., 75 % aos 40 min., 92 % aos 56 min., 96 % aos 60 min. e 100 % aos 61 min.

Ao passar pela coluna cromatográfica os derivados aminoácidos-OPA foram detectados pelo monitor de UV Shimadzu modelo SPD – 20A, ajustado com comprimento de

onda de excitação de 240 nm. As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de amostras padrão preparadas com reagentes puros (Sigma).

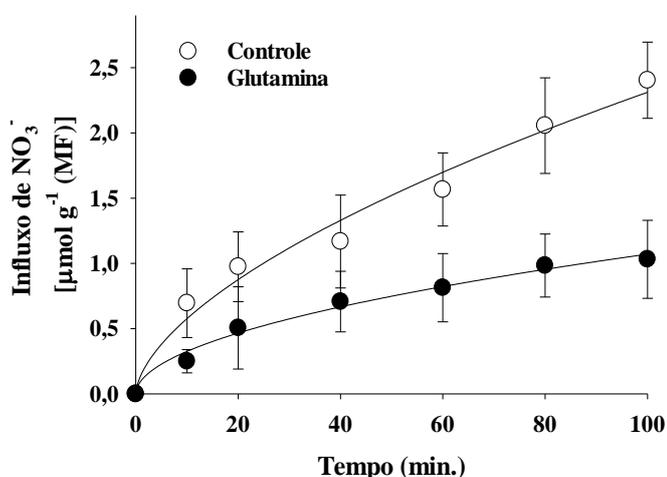
Paralelamente, realizou-se a análise de aminoácidos livres (YEMM e COCKING, 1955). Para a extração, seguiu-se o método citado anteriormente na extração de nitrato e amônio livre. Alíquotas de 0,1 a 0,5 mL de extrato (completadas até 0,5 mL com água destilada q.s.p) foram misturadas com 0,25 mL de tampão citrato 0,2 M (pH 5,0) + 0,6 mL solução de ninhidrina 5% (m/v) e KCN 0,2 mM na proporção de 1:5. O material foi agitado em vórtex e levado ao banho-maria (100 °C por 15 minutos) para o desenvolvimento da cor característica (azul-violeta). Ao final deste período, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo e então foram adicionados 0,65 mL de etanol 60%. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 570 nm.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com significância a 5 % ($P \leq 0,05$). Os resultados significativos foram comparados a partir de análise de desvio padrão e/ou submetidos ao teste de médias Tukey (5 %).

4.3. Resultados e Discussão

O primeiro teste realizado foi com a aplicação de glutamina exógena nas raízes destacadas, com o objetivo de induzir o acúmulo de glutamina dentro da célula da raiz e verificar se o acúmulo de glutamina poderia regular negativamente o influxo de nitrato por mecanismo de *feedback*. As raízes submetidas à presença de glutamina apresentaram valores de influxo de NO_3^- significativamente menores, quando comparadas com as raízes sem a presença da glutamina (Figura 4). O tratamento com glutamina promoveu uma regulação negativa no influxo de NO_3^- , que por sua vez, apresentou um aumento menos pronunciado que o tratamento controle ao longo do tempo, tendendo a estabilidade a partir dos 80 minutos de avaliação. O influxo máximo obtido nestas raízes tratadas com glutamina foi de aproximadamente $1,03 \text{ } [\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ (MF)}]$. Ao realizar a análise do influxo das raízes sem a presença da glutamina verificou-se que houve um aumento crescente do influxo de nitrato ao longo do tempo de avaliação. Durante este período, o influxo máximo obtido nas raízes não tratadas com a glutamina foi de aproximadamente $2,40 \text{ } [\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ (MF)}]$. Estes dados mostram que o tratamento com 10 mM Gln (100 minutos) promoveu uma redução no influxo máximo de NO_3^- de aproximadamente 57% , quando comparada com as raízes sem a aplicação de glutamina exógena.

Figura 4 - Influxo de nitrato em raízes de Caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES , 1 mM CaCl_2 , $\text{pH } 6,0 \pm 0,4$. Dados médios de quatro repetições $\pm \text{DP}$.



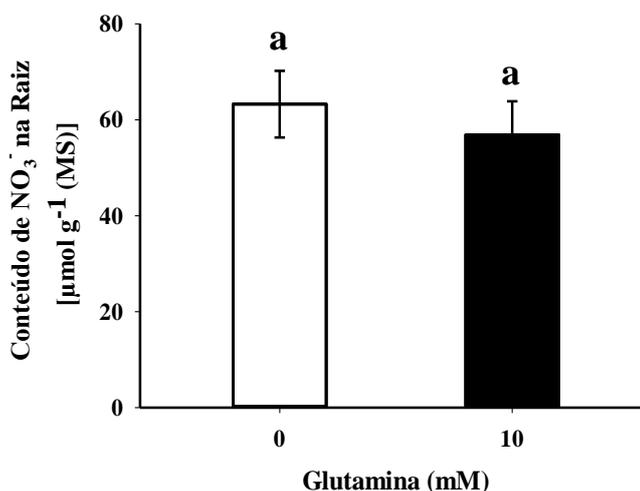
Este comportamento reforça a idéia, já apresentada, onde confirma que o influxo de nitrato em plantas tratadas com aminoácidos, principalmente a glutamina exógena, sofre uma

elevada redução, provavelmente caracterizada pelo aumento do *pool* de aminoácidos dentro da célula, que, por mecanismos ainda desconhecidos regula negativamente a aquisição de NO_3^- por *feedback* (VIDMAR *et al.*, 2000).

Realizando testes em segmentos de folhas de milho, Pal'ove-Balang e Mistrík (2002) verificaram que quando os segmentos eram submetidos a elevadas doses de glutamina (50 mM Gln) apresentavam uma redução da absorção de nitrato em aproximadamente 50 %. Estes resultados mostram que a aplicação de glutamina pode operar como inibidor da absorção de nitrato por mecanismo de *feedback*. Thornton (2004), avaliando a inibição do influxo do nitrato pela glutamina, também verificou que, em geral, o aumento da concentração de glutamina no tratamento de plantas de *Lolium perene*, resultou em uma inibição progressiva do influxo de nitrato. Resultados obtidos por Vidmar *et al.* (2000) em plantas de cevada, também mostram que a aplicação de aminoácidos reduz significativamente o influxo de nitrato, este estudo mostrou que 1 mM Gln promoveu uma inibição de 29 % no influxo de nitrato.

O conteúdo de nitrato na raiz obteve uma pequena redução quando tratado com a aplicação de glutamina, entretanto, não apresentou diferença significativa quando comparado com o tratamento controle (Figura 5). A redução do influxo de nitrato proporcionou esta leve diminuição do conteúdo de nitrato no tecido, proveniente da aplicação da glutamina exógena, como foi demonstrado na figura anterior.

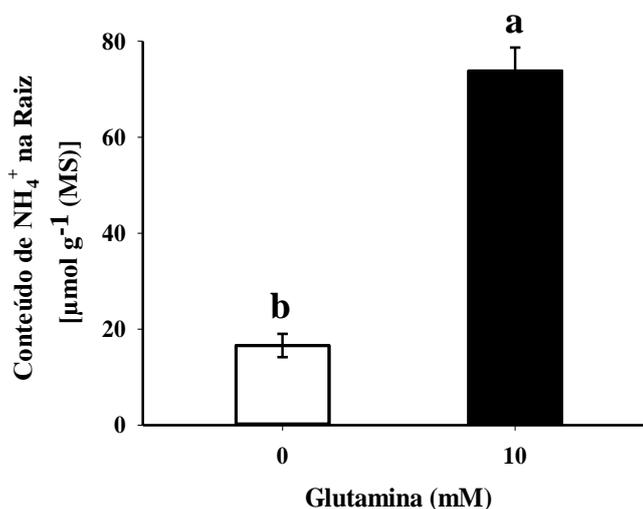
Figura 5 - Conteúdo de nitrato em raízes de Caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 , pH $6,0 \pm 0,4$. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados médios de quarto repetições \pm DP.



Contrastando com estes resultados, estudos com raízes de cevada, Fan *et al.* (2006) verificaram que o tratamento com 1 mM Gln em raízes durante o período de 6 horas aumentou em torno de 12% o conteúdo de nitrato no tecido. Avaliando a regulação de genes transportadores de nitrato, Vidmar *et al.* (2000) também encontraram resultados semelhantes, onde a presença de 1 mM de glutamina, mesmo reduzindo fortemente o influxo de nitrato, provocou um aumento de cerca de 40% no conteúdo de nitrato no tecido das raízes de cevada. Estudos mais antigos mostram que a adição de aminoácidos no meio de cultivo promove uma redução da atividade da enzima RN, que atua na redução do nitrato a amônio, assim a adição de glutamina em plantas supridas com NO_3^- pode promover o aumento do conteúdo de nitrogênio nesta forma (OAKS *et al.*, 1977).

A avaliação do conteúdo de amônio foi realizada com o intuito de verificar como seriam as respostas ao acúmulo de amônio no tecido das raízes em virtude da aplicação da glutamina exógena. A figura 6 mostra que a glutamina aplicada promoveu um aumento significativo no conteúdo de amônio na planta. A presença de 10 mM Gln aumentou quatro vezes o conteúdo de amônio nas raízes quando comparado com o tratamento sem a presença de glutamina. Este aumento no conteúdo de amônio pode ser proveniente da ação metabólica de enzimas glutaminases, que convertem a glutamina em glutamato e amônio, realizando a rota inversa da assimilação de nitrogênio. Assim, a aplicação de glutamina exógena age como uma rica fonte de formação de amônio dentro da planta.

Figura 6 - Conteúdo de amônio em raízes de caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 , pH $6,0 \pm 0,4$. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados médios de quarto repetições \pm DP.

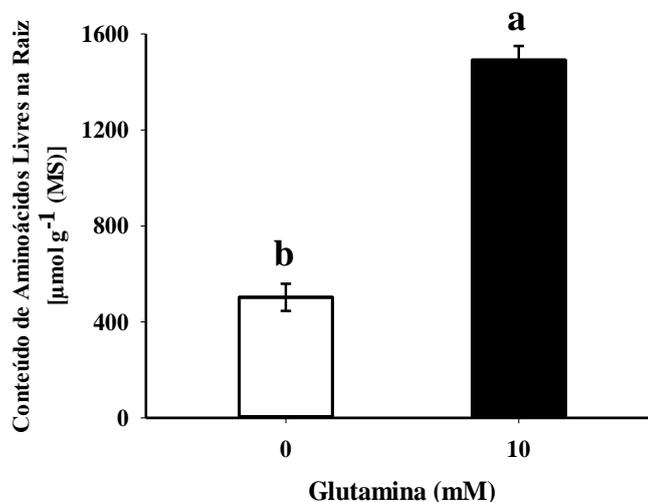


Avaliando os diferentes efeitos dos aminoácidos na absorção e sistemas de redução de nitrato, Aslam *et al.* (2001) verificaram que a acumulação de NH_4^+ foi afetada pelos tratamentos com aminoácidos. Neste trabalho, a presença de 1 mM de glutamina induziu um acúmulo de NH_4^+ , cerca de oito vezes maior que o tratamento controle, e 2 vezes maior que os tratamentos com 1 mM de glutamato e 1 mM de aspartato. Alguns trabalhos têm cogitado que o aumento do conteúdo de amônio na planta pode ser um dos candidatos importantes na inibição da aquisição de nitrato, regulando negativamente a atividade dos transportadores (KRONZUCKER *et al.*, 1999). Em trabalhos com raízes de cevada em exposição ao amônio por 24 horas, King *et al.* (1993) verificaram que o amônio promoveu uma leve inibição na concentração de 10 μM e nas concentrações de 100 μM e 1 mM foi verificado uma inibição de aproximadamente 30 % no influxo de nitrato.

A avaliação do conteúdo de aminoácidos livres foi realizada com o objetivo de verificar se a aplicação de glutamina exógena promoveria um aumento no conteúdo de aminoácidos livres no tecido das raízes de caupí. Foi possível verificar que nas raízes tratadas com glutamina, o conteúdo de aminoácidos livres no tecido foi muito maior comparado com as plantas não tratadas (Figura 7). Estes resultados já eram esperados, devido à grande quantidade de glutamina aplicada neste tratamento (10 mM de Gln).

A concentração de aminoácidos livres verificada nas raízes que foram submetidas à aplicação de glutamina, foi cerca de três vezes maior que os valores encontrados no tratamento controle. Assim, os presentes resultados permitem afirmar que houve uma grande capacidade de absorção de glutamina pelas raízes de caupí. E a glutamina, é um sinalizador com elevado potencial para regulação da aquisição de nitrato na raiz, como foi verificado pela avaliação do influxo.

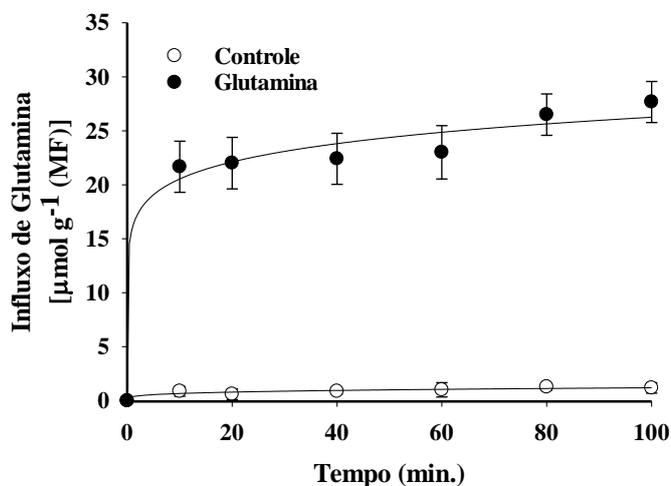
Figura 7 - Conteúdo de aminoácidos livres em raízes de caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p<0,05). Dados médios de quatro repetições ±DP.



A aplicação exógena de aminoácidos é uma importante fonte para o aumento do *pool* de aminoácidos. Este aumento no conteúdo de aminoácidos livres proporciona uma baixa demanda de N nas raízes, provocando uma regulação negativa do influxo do nitrato. Alguns trabalhos reportaram que os aminoácidos fornecidos de forma exógena promovem uma regulação negativa na aquisição de nitrato em plantas de *Arabidopsis* (DODDEMA e OTTEN, 1979), feijão (BRETELER e ARNOZIZ, 1985), soja (MULLER e TOURAINÉ, 1992) e trigo (RODGERS e BARNEIX, 1993).

Na figura 8, mostrada abaixo, foi realizado a avaliação do influxo de glutamina com o objetivo de verificar a intensidade de aquisição de glutamina pelas raízes de caupí. A partir desta análise, observou-se que as raízes tratadas com glutamina apresentaram um rápido influxo de glutamina nos primeiros 10 minutos. Após este período, os valores de influxo tenderam a estabilidade. Mostrando que, nas condições a qual foram submetidas, as raízes apresentam uma forte capacidade de absorção de aminoácidos.

Figura 8 - Influxo de glutamina em raízes de caupí. As raízes foram tratadas por um período de 100 minutos com glutamina (0 e 10 mM). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Dados médios de quatro repetições ±DP.



Vários transportadores de aminoácidos têm sido descritos em plantas, conferindo a habilidade de absorção de aminoácidos da solução do solo (LIPSON e NASHOLM, 2001).

Em raízes de *Arabidopsis*, três transportadores de aminoácidos AAP1, AAP5 (aminoácido permease) (Lee *et al.*, 2007; Svennerstam *et al.*, 2008) e LHT1 (transportador de lisina histidina) (Hirner *et al.*, 2006; Svennerstam *et al.*, 2007) têm sido mostrados para atuar como papel na absorção de aminoácidos. Avaliando a absorção de glutamina em sementes de cevada Sopenen e Vaisanen (1985) observaram que quando as sementes foram expostas a 1 mM de ¹⁴C glutamina, nos primeiros 15 minutos, houve um aumento no acúmulo de ¹⁴C, eles relacionam estes resultados como uma validação da taxa de absorção, onde eles afirmam que as sementes apresentaram um aumento constante na absorção de ¹⁴C glutamina nos primeiros minutos, porém a partir do período de 2 horas, esta absorção apresentou grande redução. A pouca quantidade de trabalhos relacionados com o influxo de glutamina em raízes de plantas, nos impossibilita de realizar inferências fisiológicas referentes ao mecanismo do seu influxo.

As avaliações dos aminoácidos isolados foram realizadas com o objetivo de caracterizar como ocorre o acúmulo dos aminoácidos primários do metabolismo de N em raízes de caupí tratadas com glutamina exógena. Pode-se observar que o tratamento com a adição de glutamina proporcionou um aumento no conteúdo de todos os aminoácidos avaliados, exceto a asparagina, que foi detectada em baixas concentrações e não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento controle.

Tabela 2 - Efeito do suprimento exógeno de glutamina (0 e 10 mM Gln) sobre o conteúdo de Aspartato (Asp), Glutamato (Glu), Serina (Ser), Glutamina (Gln) and Asparagina (Asn) em raízes de Caupí. Dados médios de quatro repetições \pm DP.

Tratamento (Gln mM)	Aminoácidos				
	Asp	Glu	Ser	Gln	Asn
	[$\mu\text{mol g}^{-1}$ (MS)]				
0	2,08 \pm 0,12	6,27 \pm 0,82	3,81 \pm 0,13	1,34 \pm 0,23	3,25 \pm 0,94
10	7,65 \pm 0,33	10,2 \pm 1,74	5,03 \pm 0,19	14,74 \pm 1,28	8,21 \pm 0,11

A presença da glutamina exógena proporcionou um aumento de 3,6; 1,6 e 1,3 vezes, para os aminoácidos aspartato, glutamato e serina, respectivamente. A aplicação da glutamina exógena também houve um forte aumento no conteúdo de glutamina endógena, o tratamento com 10 mM de glutamina promoveu um aumento de cerca de 11 vezes, quando comparado ao tratamento controle.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a aplicação exógena de glutamina aumenta a concentração de aminoácidos no tecido das plantas. Em plantas de cevada, Vidmar *et al.* (2000) verificaram que a aplicação de 1 mM de glutamina aumentou em 2,0; 1,47; 1,6 vezes o conteúdo de asparagina, glutamina e glutamato, respectivamente. Pal'ove-Balang e Mistrík (2002) trabalhando com plântulas de milho, ao aplicarem 50 mM de glutamina nas pontas das folhas, verificaram que a acumulação de aminoácido no tecido das raízes dobrou. Eles verificaram também que esta glutamina via floema controlou negativamente a absorção de nitrato.

Os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que o acúmulo de aminoácidos está inversamente correlacionado com a aquisição de nitrato pelas plantas. De fato, muitos experimentos já evidenciaram que a absorção de N inorgânico é regulada negativamente após o pré-tratamento com aminoácidos, embora estas respostas sejam bastante variáveis, dependendo também da forma de N utilizada como pré-tratamento (MULLER e TOURAINE, 1992; VIDMAR *et al.*, 2000; THORNTON, 2004).

4.4. Conclusão

A aplicação de glutamina exógena promove uma redução significativa no influxo de nitrato pelas raízes de caupí. E aumenta o conteúdo de aminoácidos livres no tecido das raízes.

4.5. Referências

ARAGÃO, R. M. de. **Mecanismos cinéticos de inibição da absorção de nitrato em raízes de feijão caupí expostas à salinidade**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; HUFFAKER, R. C. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley seedlings. **Plant Physiology**, v.99, p. 124-133, 1992.

ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; RAINS, D. W. Differential effect of the amino acids on nitrate uptake and reduction systems in barley roots. **Plant Science**, v. 160, p.219-228, 2001.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, p. 278-923, 1966.

BRETELER, H.; ARNOZIS, P.A Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf. **Phytochemistry**, v.24, p. 653-658, 1985.

CATALDO, J. M.; HAROOM, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

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

DODDEMA, H.; OTTEN, H. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate: III Regulation. **Physiologia Plantarum**, v.45, p. 339-346, 1979.

FAN, X.; GORDON-WEEKS, R.; SHEN, Q.; MILLER, A. J. Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p.1333-1340, 2006.

FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1080, 1977.

GESSLER, A.; SCNEIDER, S.; VON SENGBUSCH, D.; WEBER, P.; HANEMANN, U.; HUBER, C.; ROTHE, A.; KREUTZER, K.; RENNENBERG, H. Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. **New Phytologist**, v. 138, p.275-285, 1998.

GLASS, A. D. M.; SIDDIQI, M. Y. Nitrogen absorption by plant roots. SRIVASTAVA, H. S. SINGH, R. P. eds. **Nitrogen nutrition in higher plants**. New Delhi: Associated Publishing Co., 1995, p.21-56.

HILL, P. W.; QUILLIAM, R. S.; DELUCA, T. H.; FARRAR, J.; FARRELL, M.; ROBERTS, P.; NEWSHAM, K. K.; HOPKINS, D. W.; BARDGETT, R. D.; JONES, D. L. Acquisition and assimilation of nitrogen as Peptide-Bound and D-Enantiomers of amino acids by wheat, **Plos One**, v. 6, p. 1-4/e19220, 2011.

HIRNER, A.; LADWIG, F.; STRANSKY, H.; OKUMOTO, S.; KEINATH, M.; HARMS, A.; FROMMER, W. B.; KOCH, W. Arabidopsis LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. **The Plant Cell**, v.18, p.1931-1946, 2006.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, Berkeley, Circ. n.347, p.1-37, 1950.

KING, B. J.; SIDDIQI, M. Y.; RUTH, T. J.; WARNER, R. L.; GLASS, A. D. M. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, ammonium. **Plant Physiology**, v. 102, p.1279-1286, 1993.

KRONZUKER, H. J.; GLASS, A. D. M.; SIDDIQI, M. Y. Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of component fluxes. **Plant Physiology**, v.120, p.283-391, 1999.

KRAPP, A.; FRAISIER, V.; SCHEIBLE, W. R.; QUESADA, A.; GOJON, A.; STITT, M.; CABOCHE, M.; DANIEL-VEDELE, F. Expression studies of NTR2:1Np, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. **The Plant Journal**, v.14, p.723-731, 1998.

JONES, D. L.; OVEN, A. G.; FARRAR, J. F. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solution and soil extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 1893-1902, 2002.

LEE, R. B.; PURVES, J. V.; RATCLIFFE, R. G.; SAKER, L. R. Nitrogen assimilation and control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 1385-1396, 1992.

LEE, Y. H.; FOSTER, J.; CHEN, J.; VOLL, L. M.; WEBER, A. P. M.; TEGEDER, M. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of Arabidopsis. **The Plant Journal**, v.50, p.305-319, 2007.

LEJAY, L.; TILLARD, P.; LEPETIT, M.; OLIVE, F. D.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. **The Plant Journal**, v. 18, p. 509-519, 1999.

LIPSON, D. A.; NASHOLM, T. The unexpected versatility of plants: organic N use availability in terrestrial ecosystems. **Oecologia**, v. 128, p. 305-316, 2001.

MULLER, B.; TOURAINÉ, B. Inhibition on NO_3^- uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v.43, p.617-623, 1992.

OAKS, A.; MUHAMMAD, A.; BOESEL, I. Ammonium and amino acids as regulators of nitrate reductase in corn roots. **Plant Physiology**, v.59, p.391-394, 1977.

PAL'OVE-BALANG, P.; MISTRÍK, I. Control of nitrate uptake by phloem-translocated glutamine in *Zea mays* L. seedlings. **Plant Biology**, v.4, p.440-445, 2002.

PUIATTI, M.; SODEK, L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, p.767-773, 1999.

QUESADA, A.; KRAPP, A.; TRUEMAN, L. J.; DANIEL-VEDELE, F.; FERNÁNDEZ, E.; FORDE, B. G.; CABOCHE, M. PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. **Plant Molecular Biology**, v.34, p.265-274, 1997.

RAWAT, S. R.; SILIM, S. N.; KRONSTUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. **The Plant Journal**, v.19, p.143-152, 1999.

RODGERS, C.; BARNEIX, A. The effect of amino acids and amides on the regulation of nitrate uptake by wheat seedlings. **Journal of Plant Nutrition**, v.16, p.337-348, 1993.

SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S.; OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. **Plant Physiology**, v.114, p.583-589, 1997.

SILVEIRA, J. A. G.; MELO, A. R. B.; MARTINS, M. O.; FERREIRA-SILVA, S. L.; ARAGÃO, R. M.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Salinity affects indirectly nitrate acquisition associated with glutamine accumulation in cowpea roots. **Biologia Plantarum**, v.56 (3), p.575-580, 2012.

SOPANEN, T.; VAISANEN, E. Uptake of glutamine by the Scutellum of germinating barley grain. **Plant Physiology**, v.78, p.648-689, 1985.

SVENNERSTAM, H.; GANETEG, U.; BELLINI, C.; NÄSHOLM, T. Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the Lysine Histidine Transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. **Plant Physiology**, v.143, p.1853-1860, 2007.

SVENNERSTAM, H.; GANETEG, U.; NÄSHOLM, T. Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease 5. **New Phytologist**, v.180, p. 620-630, 2008.

THORNTON, B. Inhibition of nitrate influx by glutamine in *Lolium perenne* depends upon the contribution of the HATS to the total influx. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p.761-769, 2004.

VIDMAR, J. J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, Y.; SCHOJOERRING, J. K.; TOURAINÉ, B.; GLASS, A. D. M. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. **Plant Physiology**, v. 123, p.307-318, 2000.

VON WÍREN, N.; LAUTER, F. R.; NINNEMANN, O.; GILLISSEN, B. WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; JOST, W.; FROMMER, W. B. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hair and by light in leaves of tomato. **Plant Journal**, v. 21, p.165-175, 2000.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.

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

CAPÍTULO II

REGULAÇÃO DO INFLUXO DE NITRATO EM RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPI EM RESPOSTA AO CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS NO TECIDO

5.1 Introdução

O nitrogênio (N) é o nutriente mais exigido pelas plantas cultivadas, atuando como regulador fundamental para o crescimento. Dificilmente pode ser encontrado um ambiente em que o N não seja um fator limitante para o crescimento das plantas, o que é demonstrado pelo fato de que a adição deste fertilizante estimula o crescimento de qualquer cultura (MILLER *et al.*, 2007) e na sua falta a planta não completa seu ciclo.

As plantas absorvem nitrogênio inorgânico, principalmente na forma de nitrato e, em menor grau como amônio, como fonte para a biossíntese de compostos nitrogenados, tais como aminoácidos e proteínas (POPOVA *et al.*, 2003). Para que ocorra este processo, o nitrato, absorvido nas raízes sofre ação da enzima RN, que o reduz a nitrito. Posteriormente, este nitrito sofre a atuação da enzima RN_i, que por sua vez, converte o nitrito em amônio, e este, por sua vez, é incorporado ao esqueleto de carbono, originalmente produzido a partir da fotossíntese, produzindo os aminoácidos primários.

A absorção e assimilação de N pelas raízes são facilmente moduladas pelo suprimento de N, o que sugere que o estado nutricional da planta, de alguma forma serve como sinal atuando na regulação destes processos (mecanismo de *feedback*) (MILLER *et al.*, 2007). A modulação de processos metabólicos através do modelo de *feedback* negativo tornou-se aos poucos um processo biológico aceito pelos cientistas, no entanto, sua natureza e seus mecanismos sinalizadores permanecem ainda pouco conhecidos (SILVEIRA *et al.*, 2012).

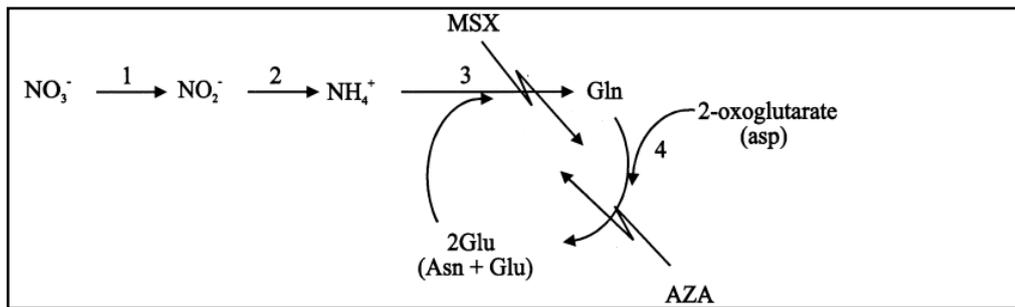
Alguns autores têm sugerido que o *pool* interno dos metabólitos de N, tais como os aminoácidos, pode indicar sobre o estado de N da planta, fornecendo um sinal para regular a absorção e assimilação de N pela planta (LEE e RUDGE, 1986; COOPER e CLARKSON, 1989). Sonoda *et al.* (2003), afirmam que os primeiros intermediários do metabolismo de N, como a glutamina, atuam como indicador do estado de N.

Diversos estudos têm trabalhado com o objetivo de verificar como ocorre a inibição da absorção e assimilação de N. Os primeiros trabalhos foram realizados a partir do suprimento de aminoácidos aplicados de forma exógena. Porém nestes trabalhos, as concentrações geralmente aplicadas (faixa de mM) acabam variando de forma complexa a concentração de aminoácidos no tecido, onde não se pode afirmar qual dos aminoácidos sintetizados desempenha o papel chave na regulação dos processos de absorção e assimilação (MILLER *et al.*, 2007).

Outra abordagem experimental empregada foi a de utilizar compostos químicos para tentar bloquear as etapas específicas da assimilação de N. Por exemplo, o processo de

incorporação do NH_4^+ para formação da glutamina, realizado pela enzima GS, pode ser inibido pela metionina sulfoximina (RAWAT *et al.*, 1999). A metionina sulfoximina (MSO) é um inibidor eficaz da atividade da GS e para a inativação da enzima GOGAT é utilizado um inibidor conhecido como azaserina (AZA), sendo estas as duas principais enzimas na rota de assimilação de amônia na planta (Figura 9), este processo de inibição enzimática pode ser utilizada para avaliação de respostas fisiológicas ao conteúdo de amônia e glutamina no tecido (OAKS *et al.*, 1998).

Figura 9 - Inibidores da rota de assimilação de amônio em plantas. 1 redutase de nitrato; 2 redutase de nitrito; 3 glutamina sintetase; 4 glutamato sintase.



Pergunta

Quais os aminoácidos que estão diretamente relacionados com o processo de inibição do influxo de nitrato pelo mecanismo de *feedback* negativo? A glutamina realmente exerce papel chave nesta regulação?

5.2 Materiais e Métodos

Em todas as fases experimentais foram utilizadas sementes previamente selecionadas de feijão-caupí [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cv. Pitiúba.

As sementes foram germinadas em papel *germtest*, em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade. Inicialmente, as sementes foram desinfetadas com NaClO 0,2 % (m/v), agitadas por 5 minutos e posteriormente lavadas por 3 vezes com água destilada e embebidas em água deionizada por uma hora. Após o período de embebição, dez sementes foram distribuídas em folha de papel *germtest* (280 x 380 mm), previamente umedecidas com água destilada, na proporção de 2,5 vezes em relação à massa do papel e ao final cobertas com outra folha também previamente umedecida e formando assim, um rolo. Ao final, foram formados três rolos, contendo 10 sementes cada. Os rolos foram cobertos com sacos plásticos desinfetados com etanol 70 % (v/v) e acondicionados em câmara de crescimento na posição vertical, onde permaneceram incubados durante um período de quatro dias a $27\text{ °C} \pm 2$, sob fotoperíodo de 12 h e radiação fotossinteticamente ativa de $240\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

A condução deste experimento foi realizada inicialmente em casa de vegetação, do Laboratório de Metabolismo de Plantas (LABPLANT) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, em Fortaleza-CE, cuja localização é 3° 44' sul, e longitude 38° 33' oeste, o clima local é classificado como AW', segundo Köppen. O período experimental foi de Julho de 2013 a Agosto de 2013. As condições ambientais no interior da casa de vegetação foram em média: fotoperíodo de 12 horas, temperaturas de 31°C pela manhã e 23°C durante a noite e umidade relativa de 55% pela manhã e 75% à noite. Após a etapa de germinação (4 dias), as plântulas foram transferidas para vasos de polietileno com capacidade para 5 litros, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada (ausência de amônio) e diluída a ½ força iônica (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição da solução nutritiva, seguindo as concentrações propostas por Hoagland e Arnon (1950) e diluída a ½ força iônica.

Macronutrientes	Concentração (mM)
Ca (NO ₃) ₂	2,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄	1
KNO ₃	2,5
Micronutrientes	Concentração (µM)
H ₃ BO ₃	40
MnCl ₂	9
Fe-EDTA	100
Na ₂ MoO ₄	0,1
ZnSO ₄	7
CuSO ₄	3

As plantas permaneceram cultivadas nestas condições por um período de 14 dias, onde as soluções foram trocadas a cada três dias. Após este período de crescimento, as plantas foram submetidas a uma aclimatação sem a presença de nitrato em solução por 4 dias, com o objetivo de esgotar as reservas internas de nitrato no tecido das plantas. Para isso, os sais KNO₃ e CaNO₃, foram substituídos por K₂SO₄ e CaCl₂ para manter constante as concentrações de K⁺ e Ca²⁺ em solução.

Após este período, as plantas foram levadas ao laboratório, onde as raízes das plantas foram destacadas, com um corte na altura da inserção da raiz no caule, e logo depois foram lavadas por 30 minutos em uma solução de CaCl₂ 1 mM para a eliminação do NO₃⁻ retido no apoplasto. Em seguida, as raízes foram transferidas para beckers contendo um meio de incubação composto de MES 1 mM, CaCl₂ 1 mM e adicionados dos respectivos tratamentos: Controle (sem inibidor), MSO 1 mM e AZA 0,25 mM, estas concentrações foram utilizadas seguindo a recomendação adotada por Vidmar *et al.* (2000). Cada tratamento foi composto por quatro repetições, onde foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado.

As raízes permaneceram sob estes tratamentos por um período de 6 horas, com o objetivo de maximizar o efeito dos inibidores na atuação sob as atividades enzimáticas da GS e GOGAT no tecido das raízes.

Após este período as raízes destacadas foram secadas em papel toalha, pesadas em balança analítica e posteriormente transferidas para erlenmeyers contendo um meio de incubação, constituído por MES 1 mM, TRIS 0,5 mM, CaCl₂ 1 mM, KNO₃ 2 mM, pH 6,0 ± 0,4 e obedecendo a relação média (massa fresca/volume) de 2 g de massa fresca de raiz a cada 25 mL de meio de incubação.

As raízes permaneceram incubadas em banho-maria por um período de 100 minutos, avaliando-se o influxo de nitrato a cada 20 minutos, por meio da coleta de uma alíquota de 50 μL da solução de incubação. O volume retirado foi imediatamente repostado com água deionizada. Nesta avaliação, as alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio e diluídas em 450 μL de água deionizada, totalizando 500 μL , onde posteriormente foram quantificadas as concentrações de nitrato pelo método do ultravioleta (CAWSE, 1967). Nesta determinação foram utilizados 0,5 mL de solução em presença de 2 mL de ácido perclórico 5 % e a leitura foi feita em espectrofotômetro de ultravioleta a 210 nm. As concentrações foram determinadas a partir da curva padrão de KNO_3 p.a. e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g MF}^{-1}$.

Ao final das avaliações do influxo, as raízes foram coletadas, lavadas em CaCl_2 1 mM e separadas em duas partes imediatamente congeladas em N_2 líquido. Posteriormente, uma das partes foi levada ao liofilizador e a outra à câmara de refrigeração (-80°C) para a realização das avaliações químicas e bioquímicas, respectivamente.

A concentração de nitrato no tecido foi realizada a partir do material liofilizado, onde se utilizou 50 mg da amostra para a extração com água deionizada a 100°C por 1 hora. O material foi agitado a 3.000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante foi coletado. Uma alíquota de 0,1 mL de extrato foi misturado a 0,2 mL da solução de ácido salicílico 5% (m/v) e adicionado a 5 mL de NaOH 2 N, e levado para leitura de absorvância em espectrofotômetro a 410 nm (CATALDO, 1975). A concentração foi obtida a partir da curva padrão de KNO_3 e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g MS}^{-1}$ do tecido.

Também foi feita a quantificação do conteúdo de amônio, seguindo a metodologia de (WEATHERBURN, 1967; FELKER, 1977) para acompanhar o acúmulo de NH_4^+ , sendo ele também citado como um provável inibidor da aquisição de nitrato. Para a extração, foi realizado o mesmo procedimento da análise anterior para determinação do nitrato. Do extrato obtido, foi transferida uma alíquota de 0,4 mL para tubos de ensaio contendo 2,5 mL da solução de reação A (5 g de fenol + 25 mg de nitroprussiato de sódio em água deionizada e o volume completado para 500 mL), agitada em vórtex, posteriormente foi adicionada 2,5 mL da solução de reação B (2,5 g de NaOH + 12,6 mL de hipoclorito de sódio comercial e o volume completado para 500 mL) e novamente agitada. Os tubos foram colocados em banho-maria por 20 minutos a 37°C e após 30 minutos em temperatura ambiente foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 625 nm. A concentração de amônio livre foi determinada utilizando-se uma curva padrão ajustada com concentrações crescentes de sulfato de amônio ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g MS}^{-1}$ do tecido.

Para a determinação dos aminoácidos, glutamina, glutamato, aspartato, serina e asparagina as raízes liofilizadas foram maceradas com N₂ líquido e armazenados em solução extratora M:C:W (metanol:clorofórmio:água; 12:5:3; v/v/v) na proporção de 1 mL por 0,5 gramas de massa seca, sob refrigeração. O extrato foi então obtido segundo Bielecki e Turner (1966), com pequenas modificações. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 g durante 10 min., em tubo de micro centrífuga (Eppendorf) a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspenso novamente em 1 mL de M:C:W, seguido de nova centrifugação a 14.000 g por 10 min. a 4 °C. Os sobrenadantes foram então reunidos, para obter o extrato total de 2 mL, em M:C:W. A cada 2 mL desse extrato, foi acrescentado 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água ultra pura, filtrada em filtro Milli-Q. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 24 horas, para separação de fases (aquosa e metanólica).

A fase superior, aquosa, foi coletada com auxílio de uma pipeta automática e concentrada por evaporação até aproximadamente 1 mL de seu volume em banho-maria a 40 °C por cerca de 24 h, com os objetivos de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes. A separação e análise dos aminoácidos livres foram efetuadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa do tipo Hypersil ODS (C 18), 250 × 4,6 mm e 5 µm, após derivatização com *o*-ftaldialdeído (OPA) conforme (PUIATTI e SODEK, 1999).

A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com os solventes, tampão fosfato para a bomba A (= "A"): [Na₂HPO₄·7H₂O 50 mM, CH₃COONa 50 mM, 1,5 mL de CH₃COOH (pH 7,25), 20 mL de tetrahydrofurano e 20 mL de metanol específico para HPLC em 1 L de volume final] e metanol 65 % para a bomba B (= "B"). Ambas soluções foram desaeradas, sendo o tampão "A" filtrado a vácuo, em filtro Millipore, por meio de membrana LCR em PTFE hidrolisado, com 0,45 µm de poro. O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se, inicialmente, 50 mg de OPA em 1 mL de metanol específico para CLAE, misturando posteriormente a 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 (ácido bórico 2,4 % p/v em H₂O, pH ajustado com NaOH 2 N) e filtrado em seguida em filtro de seringa Millipore com membrana Express em PES, de 0,22 µm. No dia de uso, 20 µL de 2-mercaptoetanol foram adicionados a cada 2,5 mL desta mistura.

Uma alíquota de 100 µL de amostra ou padrão foi misturada com 300 µL do reagente OPA + 2-mercaptoetanol em vials e agitado. Após 2 min. de reação, tempo suficiente para formar os derivados aminoácidos-OPA, as amostras foram levadas ao CLAE. Nesse momento foi iniciada a eluição da mistura em gradiente dos dois tampões, "A" e "B" através da coluna cromatográfica com fluxo de 0,8 mL min.⁻¹, em um gradiente formado por quantidades

crecentes de “B” em relação à “A”. O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção de “B” em relação à “A” da seguinte forma: 20 % aos 0 min., 28 % aos 5 min., 58 % aos 35 min., 75 % aos 40 min., 92 % aos 56 min., 96 % aos 60 min. e 100 % aos 61 min.

Ao passar pela coluna cromatográfica os derivados aminoácidos-OPA foram detectados pelo monitor de UV Shimadzu modelo SPD – 20A, ajustado com comprimento de onda de excitação de 240 nm. As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de amostras padrão preparadas com reagentes puros (Sigma).

Paralelamente, realizou-se a análise de aminoácidos livres (YEMM e COCKING, 1955). Para a extração, seguiu-se o método citado anteriormente na extração de nitrato e amônio livre. Alíquotas de 0,1 a 0,5 mL de extrato (completadas até 0,5 mL com água destilada q.s.p) foram misturadas com 0,25 mL de tampão citrato 0,2 M (pH 5,0) + 0,6 mL solução de ninhidrina 5% (m/v) e KCN 0,2 mM na proporção de 1:5. O material foi agitado em vórtex e levado ao banho-maria (100 °C por 15 minutos) para o desenvolvimento da cor característica (azul-violeta). Ao final deste período, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo e então foram adicionados 0,65 mL de etanol 60%. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 570 nm.

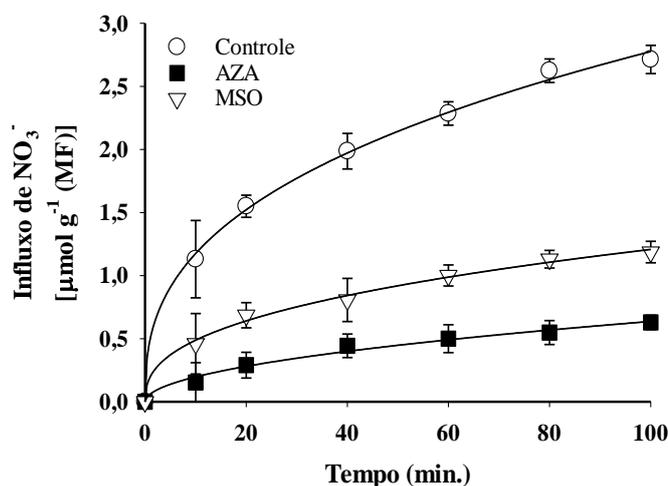
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com significância a 5 % ($P \leq 0,05$). Os dados significativos foram comparados a partir de análise de desvio padrão e/ou submetidos ao teste de médias Tukey (5 %).

5.3 Resultados e Discussão

A partir da observação do experimento anterior, na qual foi mostrado que a aplicação de glutamina exógena induz o aumento de aminoácidos livres no tecido das raízes juntamente com a redução significativa no influxo de NO_3^- por *feedback* negativo. Foi então realizado um experimento utilizando inibidores enzimáticos das enzimas primárias do processo de assimilação da amônia e formação de aminoácidos (GS/GOGAT). Com este teste, é possível verificar o acúmulo de aminoácidos separadamente em cada etapa, e assim caracterizar a probabilidade de distinguir qual aminoácido está diretamente relacionado com a redução do influxo de nitrato.

A análise dos dados permitiu observar que a exposição das raízes aos inibidores das enzimas GS e GOGAT por seis horas, reduziram significativamente o influxo de nitrato quando comparado com o tratamento controle em presença de 2 mM de NO_3^- (Figura 10).

Figura 10 - Influxo de nitrato em raízes de Caupí. As raízes foram pré-tratadas por um período de 6 horas com inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1Mm CaCl_2 , pH $6,0 \pm 0,4$. Dados médios de quatro repetições \pm DP.

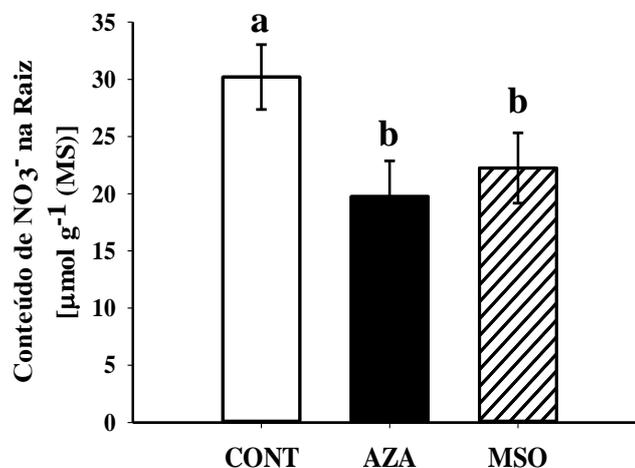


Dentre os inibidores, a AZA promoveu uma maior inibição, reduzindo o influxo em aproximadamente 76 %, quando comparada ao tratamento controle ao final dos 100 minutos de avaliação. O tratamento com o inibidor MSO apresentou uma inibição também significativa, porém com redução em torno de 56 % do influxo de NO_3^- . Estes dados encontrados são semelhantes aos encontrados por Vidmar *et al.* (2000), onde eles verificaram uma redução de 97 e 44 % no influxo ao utilizar os inibidores AZA e MSO, respectivamente.

O processo de inibição das enzimas GS e GOGAT utilizando o MSO e a AZA bloqueia algumas etapas da rota do metabolismo de N. Este bloqueio promove um acúmulo de compostos nitrogenados, estes por sua vez, podem atuar como sinalizadores na regulação do processo de influxo de nitrato (VIDMAR *et al.*, 2000).

A concentração de nitrato foi reduzida nas raízes expostas aos inibidores (Figura 11). As raízes tratadas com os inibidores não apresentaram diferença entre si, no entanto, a redução percentual da concentração de nitrato no tecido foi de 34 e 26 % para o tratamento com a AZA e o MSO, respectivamente, quando comparadas às raízes do tratamento controle.

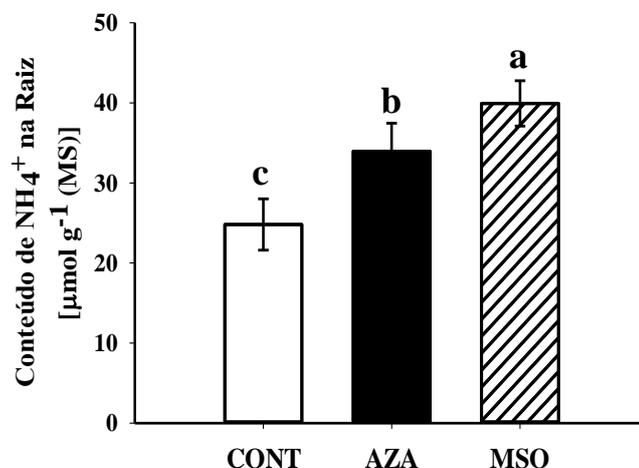
Figura 11 - Conteúdo de nitrato em raízes de Caupí. As raízes foram pré-tratadas por um período de 6 horas com inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 , pH $6,0 \pm 0,4$. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados médios de quatro repetições \pm DP.



Vidmar *et al.* (2000) avaliaram a regulação do influxo e dos genes transportadores de NO_3^- , neste estudo, eles evidenciaram que os tratamentos promoveram uma redução de aproximadamente 26 e 81 % no conteúdo de nitrato no tecido com a aplicação de MSO e AZA, respectivamente.

A concentração de amônio livre no tecido das raízes foi aumentada significativamente pela exposição aos inibidores da GS e GOGAT. As raízes tratadas com MSO apresentaram uma maior concentração de amônio no tecido, seguida do tratamento com AZA, onde aumentaram respectivamente 1,60 e 1,39 vezes quando comparados ao tratamento controle (Figura 12). Estes dados são resultado da inibição das atividades das enzimas GS e GOGAT, onde, a utilização de MSO proporciona aumento no acúmulo de amônio pela inativação da GS que por sua vez é a principal enzima de conversão do amônio em aminoácidos, diminuindo assim, o consumo de amônio.

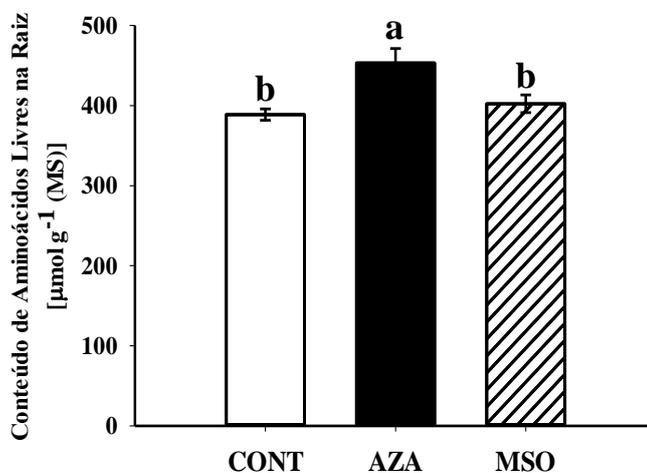
Figura 12 - Conteúdo de amônio em raízes de Caupí. As raízes foram pré-tratadas por um período de 6 horas com inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 , pH $6,0 \pm 0,4$. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados médios de quatro repetições \pm DP.



De forma seqüencial, ao utilizar a AZA, o aumento da acumulação de glutamina no tecido atua como sinal para que a GS reduza sua atividade, promovendo assim, um aumento também na acumulação de amônio, por redução da atividade da GS. O amônio, também já foi considerado como um dos prováveis candidatos a atuar na regulação da aquisição do nitrato por *feedback* (Aslam *et al.*, 1996). Em trabalhos com raízes de cevada Kronzucker *et al.* (1999) estabeleceram que a aplicação de amônio no meio de cultivo reduz o influxo e aumenta o efluxo de NO_3^- . Segundo King *et al.* (1993) a aplicação de MSO promoveu um aumento de oito vezes no conteúdo de amônio livre. Enquanto isso, Vidmar *et al.* (2000) verificaram um aumento no conteúdo de amônio livre de 4,1 e 2,3 vezes, quando tratados com MSO e AZA, respectivamente.

Na avaliação do conteúdo de aminoácidos livres, todos os tratamentos apresentaram valores relativamente elevados de conteúdo de aminoácidos livres totais. No entanto, é possível perceber que o tratamento das raízes com AZA promoveu um leve aumento (16 %) no conteúdo de aminoácidos livres totais quando comparada com os demais tratamentos, que por sua vez, não diferenciaram entre si (Figura 13).

Figura 13 – Conteúdo de aminoácidos livres em raízes de Caupí. As raízes foram pré-tratadas por um período de 6 horas com inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA). Solução de incubação contendo: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6,0±0,4. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p<0,05). Dados médios de quatro repetições ±DP.



O acúmulo de aminoácidos livres no tratamento utilizando AZA ocorreu a partir da inativação da GOGAT, acumulando possivelmente mais glutamina que os demais tratamentos. Com a aplicação do MSO houve uma inibição da atividade da GS o que por sua vez interrompeu a rota da formação de aminoácidos, mantendo o conteúdo ao nível do tratamento controle. Em trabalhos com raízes de cevada, King *et al.* (1993) verificaram que a aplicação de 0,25 mM de MSO nas raízes promoveu uma redução no conteúdo de aminoácidos livres para cerca de 1,2 % do nível das raízes do tratamento controle.

Na avaliação do conteúdo de aminoácidos isolados pode-se verificar que com a utilização da AZA houve um acúmulo de alguns compostos nitrogenados, principalmente a glutamina (Tabela 4), que por sua vez, desempenha um papel chave na regulação do influxo de nitrato por *feedback*. Este processo ocorre pela inibição da atividade da enzima GOGAT e confirma a hipótese de que a glutamina pode atuar como principal sinalizador de estado de nitrogênio na planta inibindo assim a necessidade de absorver o nitrato do meio.

A aplicação do tratamento com MSO promoveu uma forte redução significativa no conteúdo de glutamina, devido à inibição da atividade da GS interrompendo a incorporação do NH₄⁺ livre e bloqueando a rota de formação da glutamina. O aumento no conteúdo de glutamina no tratamento com a aplicação de azaserina foi de quase 7 vezes mais quando

comparado com o tratamento controle. No entanto, no tratamento com a aplicação de MSO houve uma redução de 52 % quando comparado também com tratamento controle.

Tabela 4 - Efeito dos inibidores das enzimas GS e GOGAT (1 mM de metionina sulfoximina - MSO e 0,25 mM de azaserina - AZA) sobre o conteúdo de Aspartato (Asp), Glutamato (Glu), Serina (Ser), Glutamina (Gln) e Asparagina (Asn) em raízes de caupí. Dados médios de quatro repetições \pm DP.

Tratamento	Aminoácidos				
	Asp	Glu	Ser	Gln	Asn
	[$\mu\text{mol g}^{-1}$ (MS)]				
CONT	1,10 \pm 0,10	3,12 \pm 0,26	4,45 \pm 0,34	1,34 \pm 0,23	0,54 \pm 0,29
AZA	0,42 \pm 0,03	0,79 \pm 0,12	4,96 \pm 0,09	9,23 \pm 0,21	0,22 \pm 0,06
MSO	0,93 \pm 0,01	3,95 \pm 0,89	4,25 \pm 0,63	0,64 \pm 0,04	0,36 \pm 0,04

Avaliando a regulação dos sistemas transportadores de nitrato em plantas de cevada Vidmar *et al.* (2000), verificaram que existe uma correlação negativa entre a concentração de glutamina e o número de transcritos HvNTR2.1. Padgett e Leonard (1996) estudaram como os níveis de aminoácidos livres atuavam na regulação da absorção de nitrato em milho, e neste trabalho, verificaram que a glutamina atua como regulador da absorção e assimilação de nitrato.

5.4. Conclusões

Este estudo mostra que o uso dos inibidores MSO e AZA são eficazes na regulação do influxo de nitrato através de *feedback* negativo, provocado pelo aumento no conteúdo de glutamina e NH_4^+ através da inibição das atividades enzimáticas da via GS/GOGAT.

O aumento do conteúdo de glutamina provocado pelo uso da AZA foi mais eficiente na inibição da aquisição de nitrato, quando comparado com o aumento no conteúdo de NH_4^+ , provocado pela aplicação de MSO.

5.5. Referências

ASLAM, M.; TRAVIS, R.; RAINS, D.; HUFFAKER, R. Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport systems in roots of intact barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Planta**, v.200, p.58–63, 1996.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, p. 278-923, 1966.

CATALDO, J. M.; HAROOM, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

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

COOPER, H. D.; CLARKSON, D. T. Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals — a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, p.753–762, 1989.

FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1080, 1977.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, Berkeley, Circ. n.347, p.1-37, 1950.

KING, B. J.; SIDDIQI, M. Y.; RUTH, T. J.; WARNER, R. L.; GLASS, A. D. M. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. **Plant Physiology**, v.102, p. 1279-1286, 1993.

KRONZUKER, H. J.; GLASS, A. D. M.; SIDDIQI, M. Y. Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of component fluxes. **Plant Physiology**, v.120, p.283-391, 1999.

LEE, R. B.; RUDGE, K. A. Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants. **Annals of Botany**, v.57, p. 471-486, 1986.

MILLER, A. J.; FAN, X.; SHEN, Q.; SMITH, S. J. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 111-119, 2007.

OAKS, A.; SIVASANKAR, S.; GOODFELLOW, V. J. The specificity of of methionine sulfoximine and azaserina inhibition in plant tissues. **Phytochemistry**, v.49, p.355-357, 1998.

PADGETT, P. E.; LEONARD, R. T. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.871-883, 1996.

POPOVA, O. V.; DIETZ, K. J.; GOLLDACK, D. Salt-dependent expression of a nitrate transporter and two amino acid transporter genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.569-578, 2003.

PUIATTI, M.; SODEK, L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 767-773, 1999.

RAWAT, S. R.; SILIM, S. N.; KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. **The Plant Journal**, v.19, p.143-152, 1999.

SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Feedback Regulation of the Ammonium Transporter Gene Family AMT1by Glutamine in Rice. **Plant Cell and Physiology**, v.44, p. 1396-1402, 2003.

VIDMAR, J. J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, Y.; SCHOJOERRING, J. K.; TOURAINE, B.; GLASS, A. D. M. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. **Plant Physiology**, v. 123, p.307-318, 2000.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.

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

CAPÍTULO III
(Paper for Submit)

1 **Salinity inhibits indirectly nitrate influx by glutamine content increase and low N-**
2 **demand in cowpea roots (signal feedback regulation)**

3
4 Petterson Costa Conceição Silva^a, Rafael Magalhães de Aragão^b, Evandro Nascimento da
5 Silva^c, Rafael de Souza Miranda^b, Joaquim Albenisio Gomes da Silveira^{b*}.

6
7 ^aSoil Department/CNPq/Plant Metabolism Laboratory, Federal University of Ceará,
8 CEP60455-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

9 ^bBiochemistry and Molecular Biology Department/INCTsal–CNPq/Plant Metabolism
10 Laboratory, Federal University of Ceará, CEP60455-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

11 ^cState University of Ceará, CEP 63900-000 Quixadá, Ceará, Brazil

12 *Corresponding author: Tel: +55 8533669821

13 E-mail: silveira@ufc.br (Silveira JAG.)

14
15
16 **Abstract** – This study was developed to test the hypothesis that salinity inhibits indirectly the
17 nitrate acquisition by feedback regulation caused by increased glutamine content and low N
18 demand in cowpea roots. Cowpea plants were pretreated with 0 and 50 mM NaCl since seed,
19 to restrict growth and N-demand. After pretreatment (14 days), the plants were divided into
20 control plants, plants in presence NaCl and plants recovered for 4 days in absence NaCl. Our
21 data clearly showed that nitrate influx was down-regulated in roots in presence and recovered
22 NaCl, suggesting that even without the direct presence of salt, the restrict growth resulted in a
23 reduction of N-demand, indicating an indirect effect of salt in modulation of nitrate influx .
24 The recovered plants and plants in presence NaCl accumulated high levels of amino acids,
25 mainly glutamine. In conclusion, the salinity indirectly down-regulates the nitrate acquisition
26 by an endogenous control signaled by glutamine accumulated. This accumulation is
27 associated with growth restriction and low N-demand in roots.

28
29 **Introduction**

30
31 Nitrate (NO₃⁻) is the major N source in soils for the major cultivated plants due to its
32 great significance in physiological processes such as photosynthesis, root signaling, nutrition
33 and others (Yang *et al.*, 2007; Sorgonà *et al.*, 2011). Some studies have showed that influx
34 and efflux of NO₃⁻ ions are processes regulated by different and independent mechanisms
35 (Lee and Clarkson, 1986; Aslam *et al.*, 1996).

36 Salt dissolved in the irrigation water and saline soil origin might interfere in the
37 nitrogen use by plants, and this salt effect was been previously shown (Flores *et al.*, 2003;
38 Debouba *et al.*, 2006). One of the most important abiotic factors limiting plant productivity is
39 water stress induced by drought or salinity. This is especially acute in arid and semi-arid
40 regions, like Brazilian Northeast, where cowpea (*Vigna unguiculata*) is a widely cultivated
41 species (Souza *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007).

42 Salinity affects strongly the nitrate flux processes and several reported studies have
43 employed NaCl as a model of salinity, but this approach is very simplified as it does not
44 consider some aspects of salinity components such ionic composition, cation-anion specific
45 effects and osmotic effects (Ourry *et al.*, 1992; Cezero *et al.*, 1997; Rubiningg *et al.*, 2003).
46 Furthermore, previous studies showed which acquisition of nitrate also can be regulated by
47 the nitrogen status of plant (Krapp *et al.*, 2004). Recent years, great progress has been made in
48 revealing the molecular mechanism of nitrate perception and signaling, particularly the
49 regulatory network mediating transcriptional and root developmental responses (Ho and Tsay,
50 2010).

51 Nitrate uptake by plant roots can be negatively influenced by the external supply of
52 amino acids or the tissue concentrations of amino acids (Lee *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1995;
53 Rawat *et al.*, 1999; Aslam *et al.*, 2001), but the nature of this feedback relationship is
54 complicated and may not be present in some species (e.g. Brassica napus) (Lainé *et al.*, 1995).

55 Glutamine has been quote to be effective in inhibiting the expression of inducible high
56 affinity nitrate transporters (Quesada *et al.*, 1997; Krapp *et al.*, 1998; Vidmar *et al.*, 2000).
57 Both nitrate-induced influx and transporter transcript abundance were decreased
58 simultaneously in root tissue treated with exogenously applied amino acids (Vidmar *et al.*,
59 2000). Fan *et al.* (2006) concluded which increases in cellular pool of glutamine can affect
60 nitrate reductase activity and these changes may be responsible for an increase in cytosolic
61 nitrate.

62 One interesting aspect of this feedback regulatory mechanism for N status is the
63 change associated with plant development (Miller *et al.*, 2007). The feedback regulation is
64 potentially mediated by amino acid pools between roots and shoots and is considered a signal
65 to the plant N status (Nazoa, 2003). Once accumulated internally or externally, the supplied
66 amino acids can regulate the nitrate uptake and reduction systems (Surabhi *et al.*, 2008).
67 However, few studies report as NO_3^- uptake and assimilation processes is modulated together
68 with salinity conditions.

69 In the current work, cowpea was chosen as the model plant, because mild salinity
70 affected its nitrate uptake and growth without causing salt toxicity (Silveira *et al.*, 2001;
71 Silveira *et al.*, 2012). In this study, we investigate if salt-induced growth restriction is capable
72 of negatively modulating nitrate uptake and assimilation by means of a negative feedback
73 mechanism exerted by accumulation of amino acids in the roots.

74

75 **Material and methods**

76

77 **Plant Material**

78

79 Cowpea seeds [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. pitiúba previously sterilized in
80 sodium hypochlorite solution 0.2 % (30 min.) were germinated in paper rolls under controlled
81 environment chamber at 27 ± 2 °C, 12h photoperiod and $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of
82 photosynthetically active radiation (PAR). After four days, seedlings were transferred to
83 plastic pots (12 L) containing Hoagland's solution (Hoagland and Arnon, 1950), pH 6.0 for
84 fourteen days under greenhouse conditions, where air temperature varied between 23-31 °C
85 with a mean temperature of 27 °C, air relative humidity of 75 %, a maximum photosynthetic
86 photon flux density (PPFD) of $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and photoperiod 12 h.

87 Cowpea plants were pretreated with 0 and 50 mM NaCl since seed, to restrict growth
88 and N-demand. After pretreatment (14 days), the plants were divided into control plants,
89 plants in presence NaCl and plants recovered for 4 days in absence NaCl.

90 For influx assay, a new nutrient solution (N-free) was replaced four days before of the
91 determinations inducing a NO_3^- nutritional limitation.

92 For supplementary assay, were used roots derived of plants maintained in Hoagland's
93 nutritive solution for 14 days supplied with L-glutamine (10 mM) for 100 minutes along time
94 course of influx. In other supplementary assay, also were used roots from plants maintained in
95 nutritive solution for 14 days. However, these roots were submitted to enzymes inhibitors
96 application of the GS/GOGAT pathway for 6 hours [0.25 mM azaserine (AZA); 0.5 mM
97 methionine sulfoximine (MSX)].

98

99 **Time course measurement of net NO_3^- influx**

100

101 Cowpea roots were excised and washed initially in CaCl_2 0.1 mM for 5 min and
102 transferred to incubation solution containing MES 1.0 mM, CaCl_2 0.1 mM and KNO_3 2.0 mM

103 pH 6.0 and incubated at 30 °C . The nitrate influx (consumption) was quantified by the NO₃⁻
104 concentration depletion ([NO₃⁻]_{initial} - [NO₃⁻]_{final}) in the incubation solution after 100 minutes,
105 utilizing Cawse's method (Cawse, 1967). In this determination, was used 0.5 mL of the
106 sample with 2 mL in presence of 5% perchloric acid, and the reading was made at UV
107 spectrophotometer at 210 nm.

108

109 **Na⁺, NO₃⁻, NH₄⁺ and Total Free Amino acid concentrations**

110

111 Excised roots from the 14 days seedlings were washed with 0.1 mM CaCl₂ for 5 min
112 to eliminate apoplastic ions, according to the method as previously described (Voigt *et al.*,
113 2009). The same extraction was performed to determination of the Na⁺, NO₃⁻, NH₄⁺ and total
114 free Amino acids concentrations. Lyophilized roots were finely powdered and samples of 50
115 mg were extracted with 5 mL of deionized water at 100 °C for 60 min. in hermetically closed
116 tubes.

117 The Na⁺ concentrations in the root tissues were measured using flame photometry as
118 previously described for Maia *et al.* (2010) and Silva *et al.* (2010). The NO₃⁻ concentrations in
119 tissues were performed from the lyophilized material. Was used 50 mg of sample root for
120 extraction with deionized water at 100 °C for 60 min. The material was agitated at 3000 rpm
121 and then the supernatant was collected and 0.1 mL of extract was mixed with 0.2 ml of the
122 salicylic acid solution of 5 % (w/v) and added to 5 mL of NaOH 2N, and the reading was
123 made at spectrophotometer at 410 nm. (Cataldo, 1975). The method for NH₄⁺ determination
124 was based on the formation of a compound of blue color, the indophenol, after the reaction of
125 ammonia with phenol and hypochlorite in alkaline pH induced by NaOH addition in the
126 reaction solution (Weatherburn, 1967; Felker, 1977). Was used 50 mg of sample root for
127 extraction with deionized water at 100 °C for 60 minutes. From extract obtained, 0.4 mL was
128 transferred to 2.5 mL of solution A (5 g phenol + 25 mg sodium nitroprusside + deionized
129 water and completed to 500 mL). After, it was added 2.5 mL of Solution B (2.5 g NaOH 12.6
130 mL of sodium hypochlorite + deionized water and completed to 500 mL). Placed the tubes in
131 a water bath at 37 °C for 20 min. and after 30 min. at room temperature, the absorbance was
132 read at 625 nm.

133 The total free amino acids were measured, according to Yemm and Cocking (1955). In
134 the samples, were added 0.25 ml of 0.2 M citrate buffer (pH 5.0) + 0.6 ml ninhydrin solution
135 of 5 % (w/v) and 0.2 mM KCN in a ratio of 1:5. After 15 min. was added 60 mL of 60 %
136 (v/v) ethanol. The reading was made at spectrophotometer at 570 nm.

137 **Amino acids Separation by HPLC**

138

139 Amino acids were separated and analyzed by reverse-phase HPLC as their OPA
140 derivatives, based on the method described by Jarret *et al.* (1986) and adapted by Puiatti and
141 Sodek, 1999, with some changes (Agrafioutou *et al.* 2009). A Hypersil ODS (C 18) column (5
142 μm , 4.6×250 mm) was used and eluted at 0.8 mL min^{-1} by a linear gradient formed by
143 solutions of 65 % methanol and phosphate buffer pH 7.25 (50 mM sodium acetate, 50 mM
144 disodium phosphate, 1.5 mL acetic acid, 20 mL tetrahydrofuran, 20 mL methanol in 1 L
145 water). The gradient was formed from methanol in relationship to buffer phosphate: 0 min. 20
146 %, 5 min. 28 %, 35 min. 58 %, 40 min. 75 %, 56 min. 92 %, 60 min. 96 %, 61 min. 100 %.
147 The column effluent was monitored by a Shimadzu UV detector (model SPD – 20A)
148 operating with an excitation wavelength of 240 nm.

149

150 **Statistical Analysis**

151

152 A completely randomized design was used with four replicates per treatment. An
153 individual erlenmeyer containing two roots represented a replicate. Data were analyzed by
154 ANOVA, and the means were compared by the least significant difference (LSD) test at the
155 0.05 level of confidence.

156

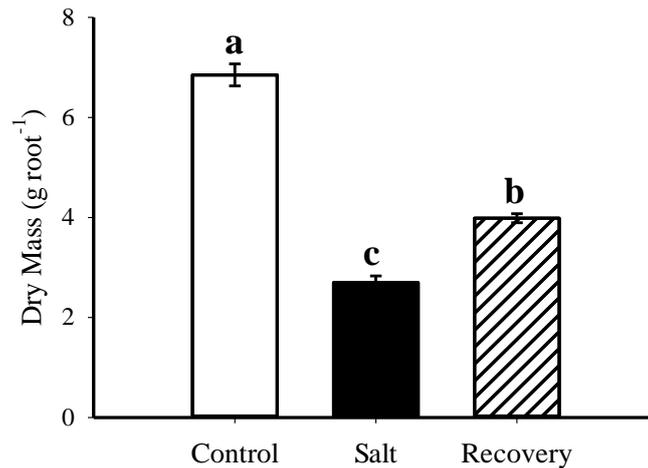
157 **Results**

158

159 In our results, the treatment where the presence of salt was maintained, promoted a
160 strong reduction in the growth and development of plants, and mainly in the roots (Figure 1).
161 This reduction was also observed in the roots of plants subjected to recovery of 4 days
162 absence salt. The reduction was around 60 and 41 %, in the roots treated with salt presence
163 and roots submitted at the recovery, respectively.

164 Contrasting the roots of the treatment maintained in salt presence and the roots
165 recovered, we checked which the removal of salt for 4 days was enough to recover few dry
166 mass of roots cowpea. However, yet remain low, compared on the control treatment.

167



168

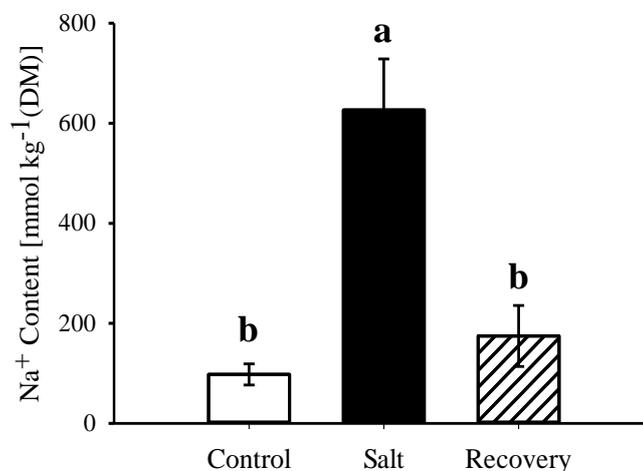
169 **Figure 1** – Dry mass of cowpea roots. Roots were pretreated for 14 days with salt (50 mM
 170 NaCl) and recovered (4 days) after salt withdrawal. Incubation solution containing: 2 mM
 171 KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6.0±0.4. Data are means of four replicates ±SD.

172

173

174 The salt application since germination promoted an increase significant in the Na⁺
 175 content in the roots of cowpea. When compared with the control treatment, the salt presence
 176 in roots provided an increment of more than six-fold, in Na⁺ content. The recovery of the
 177 roots by 4 days was sufficient to reduce (3.5-fold) the Na⁺ in tissue, becoming significantly
 178 similar at the control treatment.

179



180

181 **Figure 2** – Sodium content in cowpea roots. Roots were pretreated for 14 days with salt (50
 182 mM NaCl) and recovered (4 days) after salt withdrawal. Incubation solution containing: 2
 183 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6.0±0.4. Data are means of four replicates ±SD.

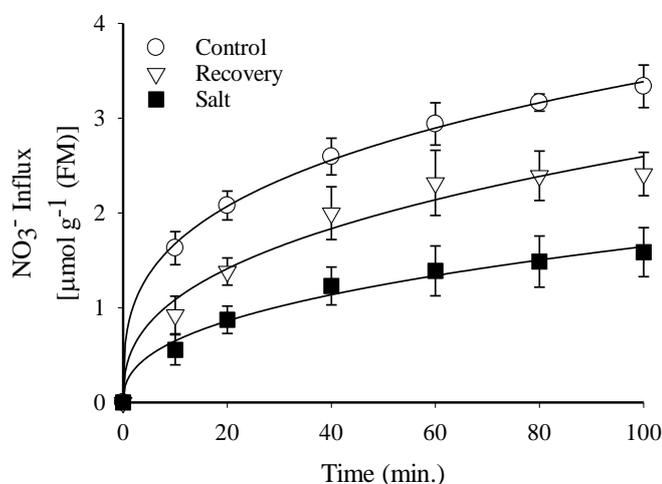
184

185

186 The NO_3^- influx process was tested with the purpose of verify the effect of the salt, as
 187 from reduce triggered in the plants growth, caused by salt. Our studies are pioneer in affirm
 188 the indirect effect of salt, and differs of previous studies, because in them always were
 189 assessed only the direct effect of salinity in the NO_3^- influx in the presence of salt.

190 The results showed, in the end test (100 minutes), a considerable reduction in the NO_3^-
 191 influx for both treatments in salt presence and recovery (Figure 3). In the treatment
 192 maintained in the presence of the salt there was a decrease around 52 % compared with the
 193 control treatment. However, in the treatment of recovery, even without the presence of
 194 sodium in tissue and medium solution, also declined, which ranged around 27 %.

195 In the first 20 minutes, the control treatment had a value of influx $2.07 \text{ } [\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1}$
 196 (FM)], while the recovery treatment only achieved this value after 40 minutes and the salt
 197 treatment until the end of the evaluation not managed to achieve this level.



198
 199

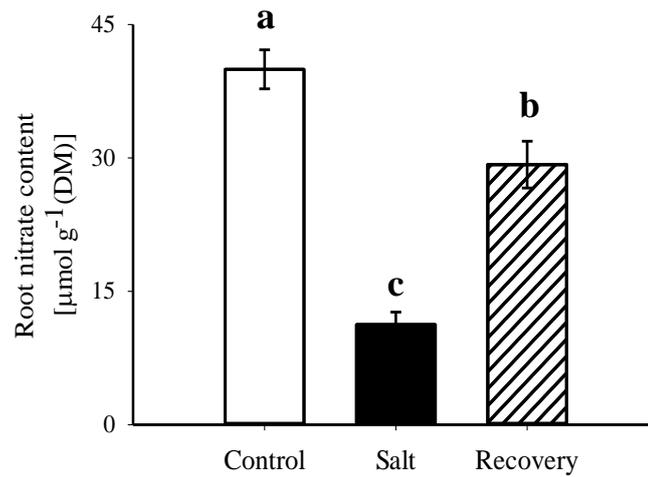
200 **Figure 3** - Nitrate influx in cowpea roots. Roots were pretreated for 14 days with salt (50 mM
 201 NaCl) and recovered (4 days) after salt withdrawal. Incubation solution containing: 2 mM
 202 KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 , pH 6.0 ± 0.4 . Data are means of four replicates \pm SD.

203
 204

205 The evaluation of NO_3^- content showed that, salt application has promoted a
 206 significantly decreased in the NO_3^- content in the root tissue (Figure 4). This reduction caused
 207 by salt application was approximately 72 % compared to the control treatment. On the other
 208 hand, the recovery treatment, the roots were able to regain the ability to accumulate NO_3^-
 209 partially, but still, lower than control treatment, ranging around 27 %. Contrasting treatment
 210 maintained in salt and the recovery, was been a 60 % decrease in NO_3^- content in the root
 211 tissue.

212

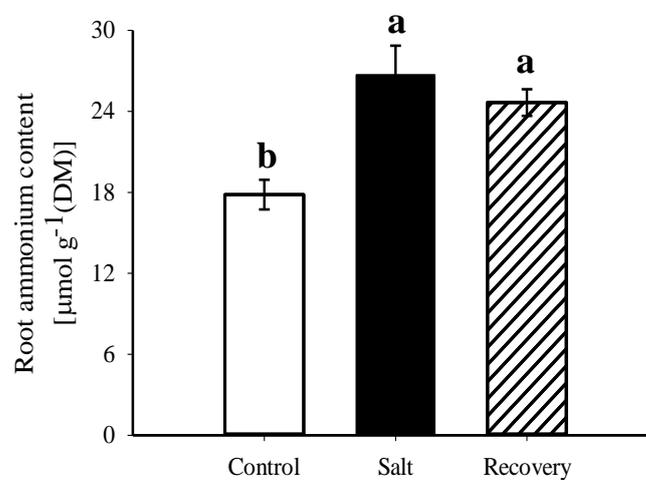
213
214
215



216
217
218
219
220
221

Figure 4 - Nitrate content in cowpea roots. Roots were pretreated for 14 days with salt (50 mM NaCl) and recovered (4 days) after salt withdrawal. Incubation solution containing: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 , pH 6.0 ± 0.4 . Data are means of four replicates \pm SD.

222 As shown in figure 5, the roots maintained in saline conditions and in the treatment of
223 roots recovery, the ammonium content increased, but not differ among them. Compared with
224 control treatment, the permanence under saline conditions and the roots recovery promoted
225 increase of almost 50 and 40 %, respectively, in NH_4^+ content in the root tissue.
226



227
228
229
230

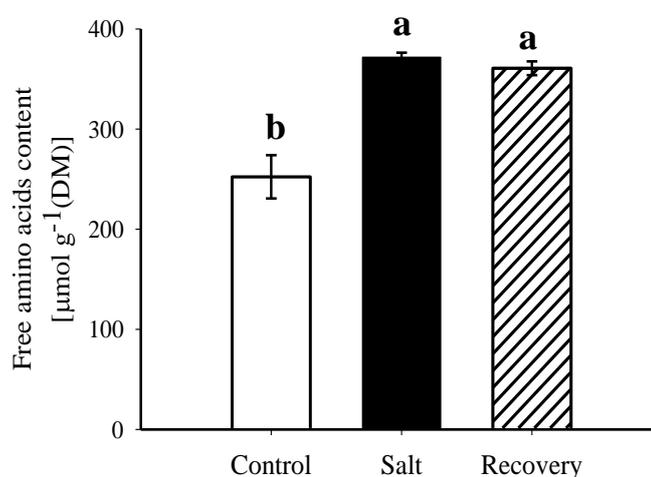
Figure 5 - Root ammonium content in cowpea roots. Roots were pretreated for 14 days with salt (50 mM NaCl) and recovered (4 days) after salt withdrawal. Incubation solution

231 containing: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6.0±0.4. Data are means of four
 232 replicates ±SD.

233

234 A significant increase in the concentration of total amino acid in roots, resultant from
 235 the presence of salt in the pretreatment solution (Figure 6). These results were similar of the
 236 NH₄⁺ content and directly contrast to that observed for nitrate influx and nitrate content. This
 237 effect was 1.5-fold higher in root under saline conditions than in the roots of the control
 238 treatment.

239 The roots submitted the recovery treatment even without the presence of salt directly
 240 in tissue, showed a strong accumulation in total amino acid content of the roots. These results
 241 added together to the other (Supplementary Fig. S6) suggests that this increase can be one of
 242 the important factors to feedback regulation of the nitrate influx.



243

244

245 **Figure 6** - Root Free amino acids content in cowpea roots. Roots were pretreated for 14 days
 246 with salt (50 mM NaCl) and recovered (4 days) after salt withdrawal. Incubation solution
 247 containing: 2 mM KNO₃, 1 mM MES, 1 mM CaCl₂, pH 6.0±0.4. Data are means of four
 248 replicates ±SD.

249

250

251 The amino acids separation analysis by reverse-phase HPLC as their OPA
 252 derivatives showed that treatment maintained in salt presence promoted high increase 3.9-fold
 253 in glutamine content. The other amino acids also had significant increase: 2.2; 2.85; 1.72-fold
 254 in content of amino acids: glutamate, aspartate and serine, respectively (Table 1).

255

256 In recovered roots of the salt, the results showed that individual amino acids
 257 accumulation had a similar behavior of the maintained in salt presence. At this treatment, the
 258 glutamine was also the amino acid that suffered the greater significant variation. When
 compared with control treatment, the roots recovered had glutamine level 3.55-fold greater

259 that the control treatment. The glutamate, aspartate and serine showed values of 1.33; 2.06;
260 1.66-fold.

261

262

263 **Table 1.** Effect of salt application (50 mM NaCl) and recovery (4 days) on the content of
264 Aspartate (Asp), Glutamate (Glu), Serine (Ser), Glutamine (Gln) and Asparagine (Asn) in
265 cowpea roots. Data are means of four replicates \pm SD.

Treatment	Amino acids				
	Asp	Glu	Ser	Gln	Asn
	[$\mu\text{mol g}^{-1}$ (DM)]				
Control	1.90 \pm 0.10	3.10 \pm 0.19	3.45 \pm 0.25	1.34 \pm 0.23	0.93 \pm 0.41
Salt	5.42 \pm 0.02	6.84 \pm 0.12	5.96 \pm 0.09	5.23 \pm 0.06	2.31 \pm 0.01
Recovery	3.93 \pm 0.03	4.15 \pm 0.49	5.75 \pm 0.13	4.76 \pm 0.09	1.82 \pm 0.04

266

267

268

269 Discussion

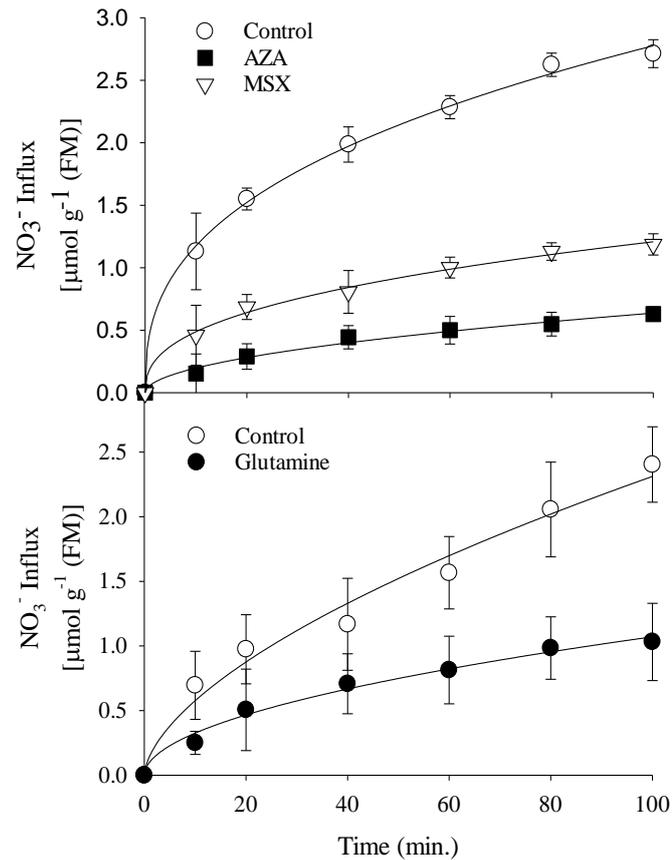
270

271 In the present work, several lines of evidence suggest that nitrate influx inhibition in
272 cowpea roots under saline conditions occurred indirectly by feedback mechanism. The low
273 capacity of nitrate acquisition in pretreated plants could be due to indirect effects of salt stress
274 triggered by negative feedback regulation due to accumulation of signaling compounds, such
275 as amino acids, because of growth restriction and impairment of protein synthesis (low N-
276 demand). Nitrate and ammonium uptake by plant roots can be negatively influenced by the
277 external supply of amino acids or the tissue concentrations of amino acids induced mainly by
278 used of enzymatic inhibitors (Lee *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1995; Rawat *et al.*, 1999). For
279 this purpose, cowpea roots were exposed to amino acids (Gln) and inhibitors of key enzymes
280 of the N-assimilation pathway (Supplementary Fig. S1).

281

282 Previously, we have established that salt-induced nitrate uptake inhibition in cowpea is
283 closely associated with shoot growth (Silveira *et al.*, 2001) and that glutamine and other
284 amino acids might exert um negative regulatory mechanism by feedback (Silveira *et al.*,
2012).

285



286

287

288 **Supplementary Figure S1** - Nitrate influx in cowpea roots. Roots were pretreated for a
 289 period of 6 hours with GS and GOGAT enzymes inhibitors (1 mM MSX and 0.25 mM
 290 Azaserine) and roots treated for a period of 100 minutes with glutamine (0 and 10 mM Gln).
 291 Incubation solution containing: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 , pH 6.0 ± 0.4 . Data are
 292 means of four replicates \pm SD.
 293

294

295 Several possible signals for the down-regulation of have been proposed including NO_3^- ,
 296 NH_4^+ and/or amino acids (Siddiqi *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Muller and Touraine, 1992;
 297 King *et al.*, 1993). One underlying assumption for these experiments is that externally
 298 supplied amino acids can be directly taken up by roots and can directly influence the internal
 299 pools of these molecules. As amino acids can be inter-converted within plant tissues, chemical
 300 inhibitors of the conversion steps were used to identify Gln, rather than glutamate, as being
 301 responsible for down-regulating nitrate transporter expression (Vidmar *et al.*, 2000).

302

303 There are only a few reports of direct inhibition of nitrate transport by amino acids.
 304 Work by Breteler and Arnozis (1985) determined that pretreatment of dwarf bean roots with
 305 many different individual amino acids inhibited nitrate uptake to varying degrees dependent
 upon prior exposure of the plants to nitrogen and the specific amino acid treatment. A more

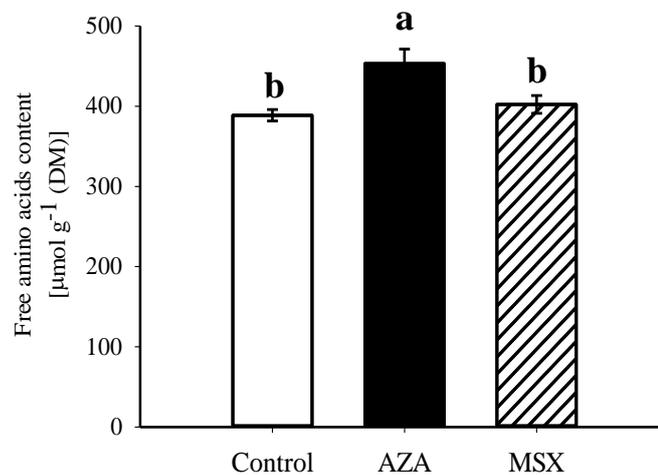
306 detailed study, presented by Muller and Touraine (1992), demonstrated inhibition of uptake
 307 by 50 % or greater by alanine, glutamine, asparagine, arginine, beta-alanine, serine, and
 308 glutamine when soybean seedlings were pretreated for 18 h prior to exposure to NO_3^- .

309 A study by Zhuo *et al.* (1999) using inhibitors of NO_3^- assimilation concluded that the
 310 NH_4^+ and Gln were both active in the down-regulation of the Arabidopsis AtNRT2.1 gene.

311 The NO_3^- uptake root systems can be divided into transport systems that operate in
 312 different levels of NO_3^- concentration in the culture environment (Crawford and Glass, 1998)
 313 and with these physiological changes, the feedback regulation by Gln on these uptake systems
 314 appears to operate of different form.

315 As would be expected of inhibitors of Gln synthetase and Glu synthase activities, the
 316 MSX and AZA treatments increased root free amino acids levels (Supplementary Fig. S2). In
 317 studies with barley roots, King *et al.* (1993) found that the application of 0.25 mM MSX roots
 318 developed a reduction in the content of free amino acids to about 1.2 % level of roots of
 319 treatment control.

320



321

322 **Supplementary Figure S2** - Root Free amino acids content in cowpea roots. Roots were
 323 pretreated for a period of 6 hours with GS and GOGAT enzymes inhibitors (1 mM MSX and
 324 0.25 mM Azaserine). Incubation solution containing: 2 mM KNO_3 , 1 mM MES, 1 mM CaCl_2 ,
 325 pH 6.0 ± 0.4 . Data are means of four replicates \pm SD.

326

327 Recent studies on drought stress in *M. truncatula* shows that the down-regulation of
 328 nodule activity under such conditions is mostly connected with a reduction in bacteroid
 329 proteins involved in nitrogen fixation. A concomitant increase in nodule AA (amino acid)
 330 concentration was mostly the result of a higher concentration of AA other than asparagine
 331 (Larrainzar *et al.* 2009).

332 Muller and Touraine (1992) demonstrated that amino acid translocation from
 333 shoots to roots controls nitrate uptake rate and suggested that the feedback inhibition of
 334 nitrate uptake by amino acids provides balance between nitrate uptake by roots with
 335 the requirement of the shoots. In this study, the main amino acids related to the inhibition
 336 of nitrate absorption was Asp, Glu, Asn, Arg, Ala, and in lesser degree, Gln and Ser.
 337 Contrasting with this study, using inhibitors of the GS/GOGAT enzymes, we verified that the
 338 most related amino acids with inhibition of the nitrate influx of was the Gln (Supplementary
 339 Table 1).

340

341 **Supplementary Table 1.** Effect of pretreatment for a period of 6 hours with GS and GOGAT
 342 enzymes inhibitors (1 mM MSX and 0.25 mM Azaserine) and glutamine (10mM) application
 343 on the content of Aspartate (Asp), Glutamate (Glu), Serine (Ser), Glutamine (Gln) and
 344 Asparagine (Asn) in cowpea roots. Data are means of four replicates \pm SD.

Treatment	Amino acids				
	Asp	Glu	Ser	Gln	Asn
	[$\mu\text{mol g}^{-1}$ (DM)]				
Control	1.10 \pm 0.10	3.12 \pm 0.26	4.45 \pm 0.34	1.34 \pm 0.23	0.54 \pm 0.29
AZA	0.42 \pm 0.03	0.79 \pm 0.12	4.96 \pm 0.09	9.23 \pm 0.21	0.22 \pm 0.06
MSX	0.93 \pm 0.01	3.95 \pm 0.89	4.25 \pm 0.63	0.64 \pm 0.04	0.36 \pm 0.04
Gln (10 mM)	7.65 \pm 0.33	10.2 \pm 1.74	5.03 \pm 0.19	14.74 \pm 1.28	8.21 \pm 0.11

345

346

347 Thus, the data analysis suggests that the limitation in the nitrate acquisition exhibited by
 348 the pretreated cowpea plants is probably associated with a coordinated process involving a
 349 negative feedback mechanism that could primarily control, at least, a part of the total NO_3^-
 350 absorbed by an indirect effect (Imsande and Touraine 1994). Fan *et al.* (2006) found that after
 351 2 h of treatment with Gln there were significant alterations in root tissue amino acid pools and
 352 they could provide a feedback signal.

353

354 The data in our study, along with data of Silveira *et al.* (2012) strongly suggest that the
 355 negative feedback hypothesis might be applicable, at least partially, to explain the salt-
 356 induced inhibition of nitrate uptake and assimilation and plant growth.

356

357

358 **Conclusion**

359

360 In summary, our results suggest that the salt stress causes a reduction in NO_3^- influx in
361 cowpea roots by a decrease in growth of plants induced by salt. Additionally, the data indicate
362 that this reduction in the influx is triggered by increase of amino acids content, mainly the
363 glutamine, that is main likely candidate to act as signal in the N-feedback regulation.

364

365 **References**

366

367 AGRAFIOUTOU, P.; SOTIROPOULOS, S.; PAPPA-LOUISI, A. Direct RP-HPLC
368 determination of underivatized amino acids with online dual UV absorbance, fluorescence,
369 and multiple electrochemical detection. **Journal of Separation Science**, v.32, p.949-954,
370 2009.

371

372 ASLAM, M.; TRAVIS, R.; RAINS, D.; HUFFAKER, R. Effect of ammonium on the
373 regulation of nitrate and nitrite transport systems in roots of intact barley (*Hordeum vulgare*
374 L.) seedlings. **Planta**, v.200, p.58–63, 1996.

375

376 ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; RAINS, D. W. Differential effect of the amino acids on nitrate
377 uptake and reduction systems in barley roots. **Plant Science**, v. 160, p.219-228, 2001.

378

379 BRETELER, H.; ARNOZIS, P.A Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of
380 dwarf. **Phytochemistry**, v.24, p. 653-658, 1985.

381

382 CATALDO, J. M.; HAROOM, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric
383 determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil**
384 **Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

385

386 CAVALCANTI, F. R.; LIMA, J. P. M. S.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.;
387 SILVEIRA, J. A. G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress
388 and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.591-600, 2007.

389

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

392

393 CEREZO, M.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; SERNA, M.D.; PRIMO-MILLO, E. Kinetics of
394 nitrate uptake by Citrus seedlings and inhibitory effects of salinity. **Plant Science**, v.126, p.
395 105-112, 1997.

396

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

399

400 DEBOUBA, M.; GOUIA, H.; VALADIER, M. H.; GHORBEL, M. H.; SUZUKI, A. Salinity-
401 induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings
402 grown under high or low nitrate medium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.409-
403 419, 2006.

404

405 FAN, X.; GORDON-WEEKS, R.; SHEN, Q.; MILLER, A. J. Glutamine transport and
406 feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic
407 nitrate pools. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p.1333-1340, 2006.

408

409 FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**,
410 v. 49, n. 7, p. 1080, 1977.

411

412 FLORES, P.; NAVARRO, J. M.; CARVAJAL, M.; CERDÁ, A.; MARTINEZ, V. Tomato
413 yield and quality as affected by nitrogen source and salinity. **Agronomie**, v.23, p. 249-256,
414 2003.

415

416 HO, C. H.; TSAY, Y. F. Nitrate, ammonium and potassium sensing and signaling. **Current**
417 **Opinion in Plant Biology**, v.13, p.604-610, 2010.

418

419 HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without
420 soil. **California Agricultural Experimental Station**, Berkeley, Circ. n.347, p.1-37, 1950.

421

422 IMSANDE, J.; TOURAINE, B. N demand and the regulation of nitrate uptake. **Plant**
423 **Physiology**, v.105, p.3-7, 1994.

424

- 425 JARRET, H. W.; COOKSY, K. D.; ELLIS, B.; ANDERSON, J. M. The separation of *o*-
426 phthalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica
427 column. **Analytical Biochemistry**, v.153, p. 189-198, 1986.
- 428
- 429 KING, B. J.; SIDDIQI, M. Y.; RUTH, T. J.; WARNER, R. L.; GLASS, A. D. M. Feedback
430 regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, ammonium. **Plant Physiology**, v.
431 102, p.1279-1286, 1993.
- 432
- 433 KRAPP, A.; FRAISIER, V.; SCHEIBLE, W. R.; QUESADA, A.; GOJON, A.; STITT, M.;
434 CABOCHE, M.; DANIEL-VEDELE, F. Expression studies of NTR2:1Np, a putative high-
435 affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. **The Plant Journal**, v.14,
436 p.723-731, 1998.
- 437
- 438 KRAPP, A.; FERRÁRIO-MÉRY, S.; TOURAINÉ, B. Nitrogen and signaling. - In: FOYER,
439 C.; NOCTOR, G. (ed.): **Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and**
440 **Respiratory Metabolism**. p. 205-222. Kluwer Academic Publishers, New York, 2004.
- 441
- 442 LAINÉ, P.; OURRY, A.; BOUCAUD, J. Shoot control of nitrate uptake rates by roots of
443 *Brassica napus* L. effect of localized nitrate supply. **Planta**, v.196, p.77-83, 1995.
- 444
- 445 LARRAINZAR, E.; WIENKOOP, S.; SCHERLING, C.; KEMPA, S.; LADRERA, R.;
446 ARRESE-IGOR, C.; WECKWERTH, W.; GONZÁLEZ, E. M. Carbon metabolism and
447 bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago*
448 *truncatula* under drought and recovery. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22,
449 p.1565-1576, 2009.
- 450
- 451 LEE, R. B.; CLARKSON, D. T. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. I.
452 Compartmental analysis from measurements of ¹³N efflux. **Journal of Experimental Botany**,
453 v.37, p.1753-1756, 1986.
- 454
- 455 LEE, R. B.; PURVES, J. V.; RATCLIFFE, R. G.; SAKER, L. R. Nitrogen assimilation and
456 control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. **Journal of Experimental**
457 **Botany**, v. 43, p. 1385-1396, 1992.
- 458

- 459 MAIA, J. M.; VOIGT, E. L.; MACÊDO, C. E. C.; FERREIRA-SILVA, S. L.; SILVEIRA, J.
460 A. G. Salt-induced changes in antioxidative enzyme activities in root tissues do not account
461 for the differential salt tolerance of two cowpea cultivars. **Brazilian Journal of Plant**
462 **Physiology**, v.22, p.113-122, 2010.
- 463
- 464 MILLER, A. J.; FAN, X.; SHEN, Q.; SMITH, S. J. Amino acids and nitrate as signals for the
465 regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 111-119, 2007.
- 466
- 467 MULLER, B.; TOURAINÉ, B. Inhibition of NO₃ uptake by various phloem-translocated
468 amino acids in soybean seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v.43, p.617–623, 1992.
- 469
- 470 MULLER, B.; TILLIARD, P.; TOURAINÉ, B. Nitrate fluxes in soybean seedling roots and
471 their response to amino acids: an approach using ¹⁵N. **Plant, Cell and Environment**, v.18,
472 p.1267–1279, 1995.
- 473
- 474 NAZOA, P.; VIDMAR, J. J.; TRANBARGER, T. J.; MOULINE, K.; DAMIANI,
475 I.; TILLARD, P.; ZHUO, D.; GLASS, A. D.; TOURAINÉ, B. Regulation of the nitrate
476 transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and
477 developmental stage. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.689-703, 2003.
- 478
- 479 OURRY, A.; MESLÉ, S.; BOUCAUD, J. Effect of osmotic stress (NaCl and polyethylene
480 glycol) on nitrate uptake, translocation, storage and reduction in ryegrass (*Lolium perene* L.).
481 **New Phytologist**, v.120, p.275-280, 1992.
- 482
- 483 PUIATTI, M.; SODEK, L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean.
484 **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 767-773, 1999.
- 485
- 486 QUESADA, A.; KRAPP, A.; TRUEMAN, L. J.; DANIEL-VEDELE, F.; FERNÁNDEZ, E.;
487 FORDE, B. G.; CABOCHE, M. PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA
488 homologous to the high-affinity nitrate transporters of the crnA family. **Plant Molecular**
489 **Biology**, v.34, p.265-274, 1997.
- 490

- 491 RAWAT, S. R.; SILIM, S. N.; KRONSTUCKER, H. J.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A. D. M.
492 AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for
493 regulation by root glutamine levels. **The Plant Journal**, v.19, p.143–152, 1999.
494
- 495 RUBINIGG, M.; POSTHUMUS, F.; FERSCHKE, M.; ELZENGA, J. T. M.; STULEN, I.
496 Effects of NaCl salinity on ^{15}N –nitrate fluxes and specific root length in the halophyte
497 *Plantago maritima* L. **Plant and Soil**, v.250, p.201-213, 2003.
498
- 499 SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M.; RUTH, T. J.; FERNANDO, M. Studies of the regulation
500 of nitrate influx by barley seedlings using $^{13}\text{NO}_3$. **Plant Physiology**, v.90, p.806-813, 1989.
501
- 502 SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. The role of
503 organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas*
504 plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.69, p.279-285, 2010.
505
- 506 SILVEIRA, J. A. G.; MELO, A. R. B.; VIÉGAS, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Salinity-induced
507 effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and**
508 **Experimental Botany**, v.46, p. 171-179, 2001.
509
- 510 SILVEIRA, J. A. G.; MELO, A. R. B.; MARTINS, M. O.; FERREIRA-SILVA, S. L.;
511 ARAGÃO, R. M.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Salinity affects indirectly nitrate acquisition
512 associated with glutamine accumulation in cowpea roots. **Biologia Plantarum**, v.56 (3),
513 p.575-580, 2012.
514
- 515 SORGONÀ, A.; LUPINI, A.; MERCATI, F.; DI DIO, L.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M.
516 R. Nitrate uptake along the maize primary root: an integrated physiological and molecular
517 approach. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p.1127-1140, 2011.
518
- 519 SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGOA, A. M. M. A.; SILVEIRA J. A.
520 G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic
521 changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental**
522 **and Experimental Botany**, v.51, p.45–56, 2004.
523

- 524 SURABHI, G. K.; REDDY, A. M.; KUMARI, G. J.; SUDHAKAR, C. Modulations in key
525 enzymes of nitrogen metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.)
526 with differential sensitivity to salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64,
527 p.171-179, 2008.
- 528
- 529 VIDMAR, J. J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, Y.; SCHOJOERRING, J. K.; TOURAINE, B.;
530 GLASS, A. D. M. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity
531 nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. **Plant Physiology**, v. 123, p.307-318, 2000.
- 532
- 533 VOIGT, E. L.; CAITANO, R. F.; MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; DE MACÊDO, C.
534 E. C.; SILVEIRA, J. A. G. Involvement of cation channels and NH_4^+ -sensitive K^+ transporters
535 in Na^+ uptake by cowpea roots under salinity. **Biologia Plantarum**, v.53, p.764-768, 2009.
- 536
- 537 WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia.
538 **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.
- 539
- 540 YANG, T.; ZHU, L.; WANG, S.; GU, W.; HUANG, D.; XU, W.; JIANG, A.; LI, S. Nitrate
541 uptake kinetics of grapevine under root restriction. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p.358-
542 364, 2007.
- 543
- 544 YEMM, E. W.; COCKING, E. F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**,
545 v. 80, p. 209-213, 1955.
- 546
- 547 ZHUO, D.; OKAMOTO, M.; VIDMAR, J.; GLASS, A. Regulation of putative high-affinity
548 nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.17,
549 p.563-569, 1999.
- 550

Apêndice A – Germinação em rolos de papel.



Apêndice B – Plantas em casa de vegetação, mantidas em solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1975), modificada a $\frac{1}{2}$ força iônica.



Apêndice C – Plantas em casa de vegetação, submetidas aos tratamentos com salinidade e recuperação.



Apêndice D – Raízes destacadas das plantas submetidas aos tratamentos de salinidade e recuperação.



Apêndice E – Raízes em meio de incubação, mantidas em banho-maria a 30°C.

