



Redução assimilatória de NO_3^- em plantas de cajueiros cultivados em meio salinizado



Ricardo A. Viégas¹, Joaquim A. G. da Silveira², Lígia M. de M. Silva¹,
Pedro R. A. Viégas³, José E. Queiroz¹ & Iza M. A. Rocha²

¹ Departamento de Engenharia Florestal, UFCG, CP 64, CEP 58700-970, Patos, PB. Fone: (83) 421-3397. E-mail: viegas@uol.com.br (Foto)

² Departamento de Bioquímica, UFC, CP 6020, CEP 60451-970, Fortaleza, CE. E-mail: silveira@ufc.br

³ Departamento de Agronomia, UFS, CP 40, CEP 55100-000, Aracaju, SE. E-mail: pviegas@ufs.br

Protocolo 198 - 30/2/2002 - Aprovado em 7/2/2004

Resumo: Com o objetivo de se avaliar os efeitos e mecanismos iniciais da ação da salinidade sobre a redução de NO_3^- e a acumulação de solutos nitrogenados, plantas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), CCP – 1001, com 42 dias de idade foram cultivadas em solução nutritiva contendo 100 mmol L⁻¹ de NaCl, durante 8 dias, em casa de vegetação. A transpiração foi o principal fator de regulação da atividade de redutase de NO_3^- (RN) que foi fortemente reduzida nas folhas. Contrariamente, a atividade de glutamina sintetase (GS) aumentou nas folhas em resposta à salinidade. Esta tendência de aumento da atividade de GS nas folhas foi acompanhada pelas concentrações de aminoácidos solúveis totais, particularmente prolina e proteínas solúveis totais. Por outro lado, o aumento nas concentrações das frações orgânicas de N, nas folhas, foi seguido por decréscimos nas concentrações de clorofilas e por acréscimos nas concentrações de NH_4^+ . É provável que o aumento da atividade de GS nas folhas de plantas de cajueiro, tenha sido induzido por um adicional suprimento de NH_4^+ e glutamato, a partir do catabolismo de aminoácidos e de proteínas e por aumentos na atividade fotorrespiratória.

Palavras-chave: estresse salino, solutos compatíveis, assimilação de N

NO_3^- assimilatory reduction in cashew plants grown in salinized medium

Abstract: To evaluate the effects and initial-action mechanism of salinity on NO_3^- reduction and N compounds accumulation, 42-day-old *Anacardium occidentale* (CCP-1001) plants were hydroponically grown in 100 mmol L⁻¹ NaCl for 8 days (short-term experiment), in greenhouse. The results show that reduction in transpiration rates due to salinity had a relevant role in the regulation of NO_3^- reductase (NR) activity, which decreased considerably in leaf. On the contrary, glutamine sintetase (GS) activity increased in leaf due to salinity. The increase in activity of GS in leaf was followed by the soluble amino acids concentration, in particular proline, and by the total soluble proteins content as well. On the other hand, increase in concentration of organic N fractions in leaf was concomitant to decrease in total chlorophyll content and increase in concentration of NH_4^+ . It is most likely that the increase in GS activity of cashew leaf may be due to additional supply of NH_4^+ and glutamate coming from catabolism of amino acids and proteins and from increase in photorespiratory activity.

Key words: salinity stress, compatible solutes, N assimilation

INTRODUÇÃO

Apesar da cajucultura ser praticada intensivamente na faixa litorânea e em regiões de clima semi-árido do Nordeste brasileiro, portanto em áreas sujeitas às condições de salinização dos solos, são praticamente inexistentes trabalhos sobre a resposta do cajueiro ao estresse salino, sobretudo no seu estágio inicial de

crescimento. Dados recentes têm sugerido que o metabolismo de N nessas plantas é por demais afetado pela salinidade, em particular nos primeiros dias de estresse (Meneses Junior, 2002); entretanto, os mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados a esta resposta não foram ainda completamente elucidados.

Entre as plantas glicófitas, a exemplo do cajueiro, há uma larga variabilidade oscilando de extremamente sensíveis até

espécies altamente tolerantes à salinidade (Greenway & Munns, 1980). As modificações no metabolismo, induzidas pela salinidade, são conseqüências de várias respostas fisiológicas da planta, dentre as quais se destacam modificações em: balanço iônico, status de água, comportamento estomatal, eficiência fotossintética, alocação e assimilação de carbono e na nutrição mineral, principalmente com relação à absorção e à assimilação de NO_3^- (Munns & Termaat, 1986).

A redução assimilatória do NO_3^- tem assumido importância central em plantas expostas à salinidade. O NO_3^- é a principal forma de nitrogênio disponível para as culturas em condições de campo, sendo a produtividade das plantas substancialmente influenciada pela aquisição e redução deste íon nutriente, e por sua incorporação a aminoácidos e proteínas (Beevers et al., 1993). Os decréscimos observados na absorção de NO_3^- , em plantas cultivadas em condições de salinidade, têm sido associados a uma reduzida absorção deste íon ou, ainda, à competição existente entre ele e o íon Cl^- (Siddiqi et al., 1992).

A redução de NO_3^- é realizada mediante duas reações consecutivas catalisadas pelas enzimas redutase de NO_3^- (RN; E.C. 1.6.6.1) e redutase de NO_2^- (RNi; E.C. 1.7.99.3) com formação de NH_4^+ (Lea, 1997). A primeira reação é considerada um passo limitante e controla o fluxo assimilatório de NO_3^- até NH_4^+ e aminoácidos (Redinbaugh & Campbell, 1991). O NH_4^+ , produzido a partir da assimilação do NO_3^- nas folhas, é imediatamente assimilado via GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase) dentro dos cloroplastos (Lea, 1997). Além do NH_4^+ do NO_3^- , as folhas de plantas C_3 produzem grandes quantidades de NH_4^+ via fotorrespiração, que é também reassimilado através de GS (Robinson et al., 1991). Apesar da redução de NO_3^- ser considerada a reação marca-passo da conversão do N- NO_3^- até aminoácidos, existe também um controle importante realizado pela atividade de GS evitando acúmulo de NH_4^+ e possibilitando a rápida entrada do N-inorgânico em aminoácidos (Silveira et al., 1998).

Sob condições normais, os processos de redução do NO_2^- até NH_4^+ e o da assimilação de NH_4^+ até aminoácidos, são tão ou mais rápidos que a redução de NO_3^- (Lea, 1997), o que reduz a possibilidade de acúmulo de NH_4^+ e de NO_2^- em níveis tóxicos aos tecidos. Em situações de estresse hídrico ou salino, a atividade de RNi é menos afetada que a atividade de RN (Roosens et al., 1998) evitando-se desta maneira, o acúmulo de NO_2^- . Há, na literatura, evidências de que em condições de estresses hídrico e salino severos, as atividades de GS e GOGAT tendem a aumentar em virtude de incrementos na atividade de proteases e no catabolismo de aminoácidos (Berteli et al., 1995).

Tem-se observado que algumas plantas quando cultivadas em condições de estresse salino, acumulam uma classe de moléculas, conhecidas como solutos compatíveis (Liu & Zhu, 1997), constituída de proteínas, certos aminoácidos, particularmente prolina (Pro) além de compostos quaternários de amônio derivados de aminoácidos precursores (Rhodes et al., 1986). Estudos têm constatado que o estresse salino resulta em aumento nas taxas de síntese de Pro (Stewart, 1981; Rhodes et al., 1986; Rhodes & Handa, 1989; Silveira et al., 1998). A acumulação de Pro pode envolver, em parte, indução (Roosens et al., 1998) e/ou ativação das enzimas responsáveis pela biossíntese de Pro em associação, possivelmente com:

relaxamento da inibição tipo “feedback” na via de síntese de Pro (Delauney et al., 1993); decréscimo nas taxas de oxidação de Pro para glutamato mediados por regulação da enzima Pro desidrogenase (Elthon & Stewart, 1982); redução da utilização de Pro para síntese de proteínas (Roosens et al., 1998) e aumento no “turnover number” das proteínas (Silveira et al., 1998).

Uma vez que em condições normais de cultivo a síntese de solutos orgânicos nitrogenados é dependente da assimilação primária de NH_4^+ , o objetivo do presente estudo foi investigar as possíveis relações na fase inicial do estresse salino, entre a acumulação desses solutos, particularmente de Pro, com as atividades das enzimas GS e RN, em plantas jovens de cajueiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições ambientais

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. No interior da casa-de-vegetação, a temperatura variou de 28 até 36 °C durante o dia, e de 24 até 27 °C durante a noite e a umidade relativa, de 40 a 80% (dia/noite). A radiação fotossinteticamente ativa máxima nas proximidades das folhas foi aproximadamente de 1.200 $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mensurada com um “quantum sensor” acoplado a um porômetro (LI-1600 steady state porometer, Li-Cor, USA).

Obtenção e aclimatização das plantas

Sementes de *Anacardium occidentale* L. (clone CCP-1001) foram superficialmente esterilizadas em uma solução comercial de hipoclorito de sódio a 10% (v/v) com contínua aeração, durante 10 min, quando então foram lavadas com água destilada; em seguida, as sementes foram acondicionadas para germinar em um recipiente plástico (20 x 40 x 5 cm) contendo vermiculita, com a umidade do substrato, durante a germinação, mantida próxima a 50% da sua capacidade máxima de retenção de água, a partir de adições diárias de uma solução contendo 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de CaSO_4 (Viégas & Silveira, 2002).

Decorridos 20 dias da germinação, as plantas de cajueiro foram transferidas para vasos plásticos (14 x 14 x 27 cm), contendo 5,0 L de solução nutritiva, aerada, apresentando a seguinte composição: (0,4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em KNO_3 ; 0,3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em CaCl_2 ; 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em MgSO_4 ; 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em K_2HPO_4 ; 0,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em B^{3+} ; 0,09 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em Mn^{2+} ; 0,18 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em Cl_2 ; 0,003 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em Cu^{2+} ; 0,007 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em Zn^{2+} e 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em Fe^{3+} - EDTA) durante 10 dias (Meneses Junior, 2002). Os vasos foram fechados com tampa, sob pressão, a qual contava com um orifício no centro, revestido com isopor, para receber as plantas. Nesta fase de adaptação ao novo substrato, a solução nutritiva foi renovada a cada 2 dias. O pH da solução nutritiva foi mantido próximo a $5,5 \pm 0,5$, a partir de correções diárias com NaOH ou HCl 0,01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Concluída esta fase, a concentração iônica da solução nutritiva foi aumentada dez vezes e os tratamentos iniciados 12 dias após (plantas com 42 dias de idade).

As plantas de cajueiro foram então expostas à presença ou não (controle) de 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl, na solução nutritiva, renovada diariamente, no início da manhã (às 08:00 horas), durante o período de tratamento (8 dias). O pH da solução foi

mantido próximo a 5.5 ± 0.5 . No tempo 0 (início do tratamento) e, subseqüentemente, a 1, 4, e 8 dias, a atividade *in vivo* de RN nas folhas e as taxas de transpiração das plantas foram estimadas. Em cada época de colheita cinco plantas por tratamento foram coletadas e separadas em raízes, caules e folhas. A massa fresca das diferentes partes das plantas foi determinada seguindo-se uma imersão em nitrogênio líquido e armazenamento a -20°C ; posteriormente, as amostras de tecido vegetal foram liofilizadas, moídas, passadas em peneira com abertura de malha de 30 mesh, e armazenadas para posteriores análises químicas e bioquímicas (Silveira et al., 1988).

Delineamento experimental

Os tratamentos foram distribuídos ao acaso, obedecendo a um fatorial (2×4) correspondendo, nesta ordem, à ausência e à presença de 100 mmol L^{-1} de NaCl, e a quatro épocas de colheita (0, 1, 4 e 8 dias), com 5 repetições, perfazendo o total de 40 parcelas. A parcela correspondeu a uma planta por vaso. Os programas SIGSTAT e STATGRAPHICS foram utilizados para o cálculo da ANOVA, erro padrão das médias e para análises de regressão polinomial (linear e quadrática). O efeito da salinidade e das épocas de colheita foi analisado mediante teste F. Para o fator épocas de colheita realizou-se análise de regressão.

Análises químicas e bioquímicas

Concentração de proteínas solúveis: Amostras de tecidos congelados de folhas ou de raízes (12g) foram maceradas em nitrogênio líquido; em seguida, foram submetidas a uma extração em presença de 12 mL de uma solução tampão (tris-HCl 100 mmol L^{-1} ; EDTA-Na $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$; polyvinylpyrrolidone 5% m/v; mercaptoethanol $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$) por 5 min, a 4°C (Bradford, 1976). Após filtração em polietileno microporoso, o extrato foi centrifugado (30.000 g), a 4°C , por 15 min. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, a 595 nm .

Concentração de aminoácidos livres totais (N- α -amino):

Amostras de 100mg de tecido vegetal foram acondicionadas em tubos de ensaio, contendo 5,0 mL de água destilada, incubados em banho-maria, a 100°C , por 30 min e centrifugados (6.000 g) por 10 min. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspenso em 5,0 mL de água destilada e reextraído, como citado antes. O volume final dos extratos provenientes das duas etapas de extração foi elevado para 10 mL, com água destilada/deionizada. A dosagem dos aminoácidos livres totais ocorreu em tubos de ensaio contendo 0,1 mL de extrato, 1,0 mL de uma solução tamponada a pH 5,0 contendo $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de citrato, 1,0 mL do reagente de ninhidrina (KCN $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e ninhidrina 5% em methoxy ethanol) e 4,0 mL de água destilada. Os tubos, hermeticamente fechados, foram acondicionados em banho-maria, a 90°C , por 15 min. A reação foi interrompida mediante contato dos tubos de ensaio com água, a 2°C . As leituras foram feitas em espectrofotômetro, a 570 nm .

Concentração de prolina (Pro) livre: A determinação dos teores de Pro livre seguiu a metodologia de Bates (1973). Amostras de tecido vegetal foram maceradas em almofariz contendo 3,0 mL de ácido sulfossalicílico 3% (m/v); em seguida, 2,0 mL do extrato

produzido foram transferidos para tubos tipo “ependorf”, quando então se procedeu a uma centrifugação (12.000 g), por 10 min. Aliquotas de 1,0 mL do extrato foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1,0 mL de ninhidrina ácida e 1,0 mL de ácido acético glacial concentrado. Os tubos, hermeticamente fechados, foram acondicionados em banho-maria, a 100°C , por 1 h. A reação foi interrompida mediante o contato dos tubos de ensaio com água, a 2°C ; depois, uma alíquota de 2,0 mL de tolueno foi adicionada ao meio de reação. Após agitação por 15 s, duas fases foram formadas. A fase aquosa superior (cromóforo + tolueno) foi recuperada e submetida à leitura em espectrofotômetro, a 520 nm .

Atividade *in vivo* de redutase de nitrato (RN): O método utilizado para determinação da atividade *in vivo* de RN, foi o de Hageman & Hucklesby (1971). Amostras de 200 mg de tecido vegetal (discos foliares com diâmetro aproximado de 0,5 cm e fragmentos de raiz de até 5,0 mm de comprimento) foram acondicionadas em tubos de ensaio tipo “vacutiner”, contendo 5,0 mL da solução de incubação (tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5; isopropanol 1,0% (v/v); KNO_3 50 mmol L^{-1} ; cloranfenicol 1,5% m/v); em seguida, procedeu-se à realização de vácuo com auxílio de uma bomba de sucção com -67 kPa , durante dois minutos; logo após, os tubos de ensaio foram acondicionados em banho-maria, durante 30 minutos, a 35°C , seguindo-se a retirada de alíquotas de 2,0 mL que foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 1,0 mL da solução de reação (1,0 mL de sulfanilamida 1,0% em HCl $2,4 \text{ mol L}^{-1}$; e 1,0 mL de N-1-naftilenodiamina dicloridrato (NNEDA) 0,02%); decorridos 15 min, as soluções foram lidas em espectrofotômetro, a 540 nm ; enfim, a atividade de RN foi estimada a partir da formação de NO_2^- no meio de reação.

Atividade *in vitro* de glutamina sintetase (GS): Amostras de 2,0 g de tecido vegetal foram maceradas por 5 min, em um meio contendo 12 mL do tampão de extração (tris-HCl 25 mmol L^{-1} pH 7,6; EDTA-Na $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$; mercaptoethanol $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$; polivinylpyrrolidone 5%) seguidas de filtração e centrifugação (30.000 g) do extrato, por 30 min, a 4°C .

A estimativa da atividade GS (EC 6.3.1.2, GS) seguiu o método biossintético do hidroxamato (Silveira et al., 1998) e alíquotas de 0,5 mL foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 0,6 mL de tampão tris-HCl $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,6; 0,2 mL de Na^+ -glutamato $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; 0,2 mL de ATP 30 mmol L^{-1} ; 0,2 mL de MgSO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, cuja reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL da mistura ($\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ + NaOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Após incubação em banho-maria, por 30 min e a 32°C , a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de FeCl_3 a 10% (m/v) em HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ + ácido tricloroacético 24% (m/v) + HCl 50% (v/v). Subseqüentemente, a solução foi centrifugada (7.000 g) durante 10 min, a temperatura ambiente e sua absorvância lida em 540 nm .

Concentração de clorofilas: A determinação das concentrações de clorofilas totais obedeceu a metodologia descrita por Whitham et al., (1971). Amostras de folhas (50 mg) foram maceradas por 5 min, a temperatura ambiente, em almofariz contendo 20 mL de acetona 80% (v/v). Após centrifugação (8.000 g) por 5 min, a

temperatura ambiente, alíquotas da solução foram tomadas para leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 645, 652, e 663 nm.

Concentração de NH_3 livre: Amostras de 100 mg de tecido vegetal foram submetidas a extração em tubos de ensaio contendo 4,0 mL de KCl 1,0 mol L^{-1} (pH 5,0) em agitador circular a 25 °C, durante 6 h (Silveira et al., 1998). Após centrifugação a 10.000'g, por 5 min., 0,4 mL dos extratos foi transferido para tubos de ensaio contendo 2,5 mL da solução de reação A (5 g de fenol + 0,025 g de nitroprussiato de sódio em 500 mL de H_2O destilada); em seguida à agitação, foram acrescentados 2,5 mL da solução de reação B (2,5 g de NaOH + 12,6 mL de hipoclorito de sódio comercial + H_2O destilada q.s.p. 500 mL de solução) aos tubos de ensaio, que foram incubados em banho-maria, a 37 °C, por 20 min.; decorridos 60 min do término da incubação, as absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm.

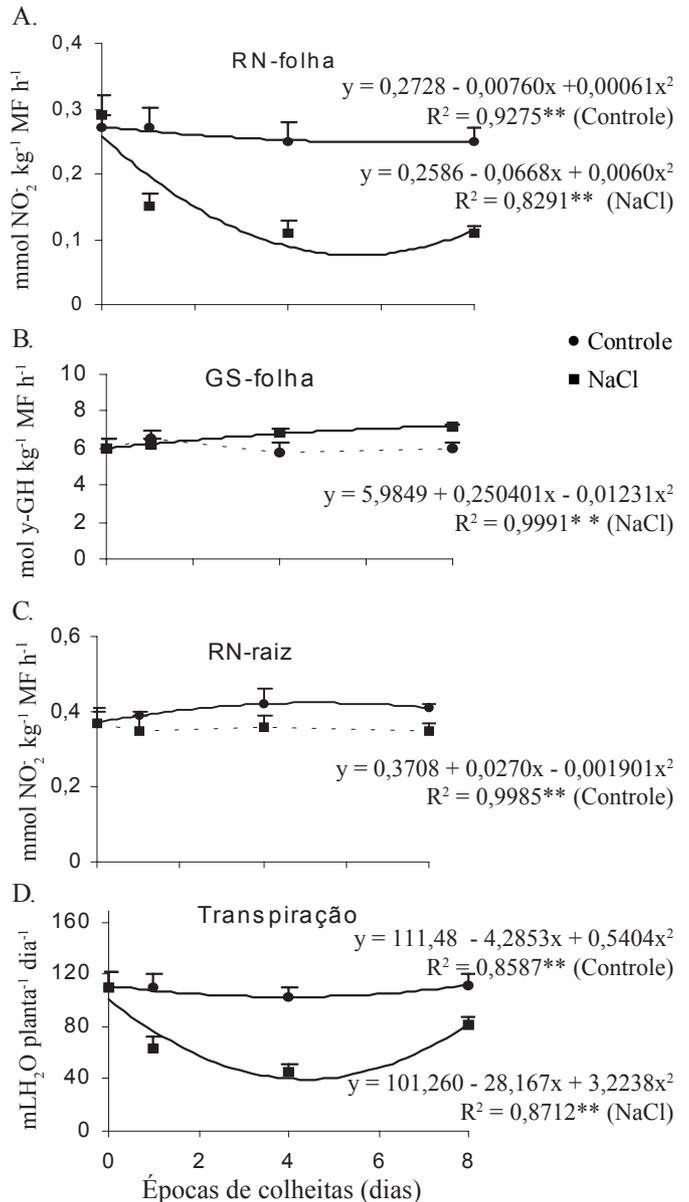
Transpiração: As soluções nutritivas em cada tratamento foram completamente renovadas a cada dia e as diferenças entre o volume inicial (5,0 L) e aquele observado 24 h após foram consideradas na estimativa das taxas de transpiração (mL planta⁻¹ dia⁻¹). Vasos com o mesmo volume e com as diferentes soluções, mas sem plantas, foram utilizados para corrigir a evaporação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade de redutase de nitrato (RN) e glutamina sintetase (GS)

A salinidade afetou significativamente ($p < 0,01$) as atividades in vivo de RN e in vitro de GS. Nas folhas, a atividade in vivo de RN, decorridas 24 h da adição de 100 mmol L^{-1} de NaCl na solução nutritiva decresceu, de acordo com a análise de regressão, 25% em relação ao valor observado no tempo 0 (Figura 1). Após o quarto dia de tratamento a atividade de RN se manteve praticamente constante até o final do período experimental (8 dias). Nas raízes, por outro lado, embora tenha sido constatado efeito significativo da salinidade sobre a atividade da RN, os decréscimos relativos (em relação ao controle) na atividade desta enzima foram substancialmente inferiores àqueles observados nas folhas. Constatou-se que, 24 h após a aplicação do tratamento salino, a exemplo do observado para a atividade de RN nas folhas, ocorreu redução igualmente significativa nas taxas de transpiração das plantas de cajueiro (Figura 1). Desta forma, torna-se evidente a forte dependência da RN por uma manutenção adequada do fluxo transpiratório de água através da planta. Esta dependência tem sido reportada na literatura e, a princípio, vem sendo associada a uma redução na concentração do íon NO_3^- , substrato da RN, em direção aos sítios ativos da enzima (Sidiqui et al., 1987) ou, ainda, a um efeito direto da redução do potencial de água do tecido, provocado pela salinidade sobre a atividade ou a indução da síntese de RN (Rao & Gnanam, 1990).

A atividade de GS nas folhas, contrariamente ao comportamento observado para a RN, foi pouco alterada nas primeiras 24 h de tratamento, após o que apresentou tendência quadrática de acréscimo atingindo, nos 4° e 8° dias do tratamento salino, valores 15 e 17% maiores que aqueles observados no



(**) significativo a 1 % de probabilidade; as barras correspondem ao erro padrão das médias; (---) regressões linear e quadrática não significativas (teste F, $p > 0,01$)

Figura 1. Atividade de glutamina sintetase (GS) e redutase de NO_3^- (RN) e taxas de transpiração em plantas de cajueiro cultivadas sem (controle) ou com 100 mmol L^{-1} de NaCl.

respectivo controle (Figura 1). Esta tendência de decréscimo ou de acréscimo para a atividade de RN e GS foi observada, respectivamente, e em maior magnitude, nas folhas das plantas de cajueiro tratadas com NaCl, pelo longo período de 40 dias (Viégas & Silveira, 1999). De acordo com os autores, a atividade de RN nas folhas das plantas cultivadas em ambiente salino (50 e 100 mmol L^{-1} de NaCl) representou apenas 35% da observada nas plantas controle, enquanto a atividade de GS, nesses dois níveis de salinidade, exibiu um acréscimo correspondente a aproximadamente 100%.

Considerando-se que a RN é um passo limitante e regulador da assimilação do NO_3^- exógeno (Lea, 1997) um decréscimo na atividade desta enzima levaria, a princípio, a reduções na atividade de GS. Desta forma, parece razoável que nas condições experimentais utilizadas neste estudo, uma fonte

adicional de NH₄⁺ (substrato da GS) tenha sido favorecida ensejando, como consequência, aumentos na atividade desta enzima. Na literatura, acréscimos na atividade de GS em condições de estresse salino, têm sido relacionados ao suprimento adicional de NH₄⁺ e glutamato, originados a partir do catabolismo de aminoácidos e de proteínas (Mifflin & Lea, 1980).

Um forte indicativo de aumento no catabolismo, tanto de proteínas como de aminoácidos, nas plantas de cajueiro tratadas com NaCl, foram os teores de NH₄⁺ e de clorofilas totais que, nas folhas (Figura 2) foram, respectivamente, maiores e menores com o aumento do tempo de tratamento das plantas com NaCl. Por outro lado, quando consideradas em conjunto, é possível que as altas temperaturas e os baixos valores de umidade relativa frente aos quais o experimento foi conduzido (Materiais e Métodos) e, também, a substancial redução na absorção de água observada nas plantas tratadas com NaCl (Figura 1) condições restritivas à fotossíntese (Lea & Leegood, 1994) tenham estimulado o reciclamento da glicina em decorrência de um possível estímulo induzido pela salinidade, ao processo fotorrespiratório originando, igualmente, NH₄⁺ e glutamato. Nesta linha de pensamento resultados de estudos com plantas mutantes sugerem que um dos papéis de GS nas folhas é a reassimilação do NH₄⁺ derivado da fotorrespiração (Wallsgröw et al., 1987).

Acumulação de aminoácidos livres e proteínas solúveis totais

Sintomas visíveis de necrose (prematura senescência) nas folhas basais das plantas de cajueiro (observações visuais) foram observados a partir do 6º dia do estresse salino. Esses sintomas podem refletir ocorrência de níveis tóxicos de Na⁺ e de Cl⁻ no tecido vegetal foliar o que, segundo Nabil & Coudert (1995) leva à morte precoce das folhas basais. Ademais, os sintomas de senescência nas folhas foram associados a reduções nos teores de clorofila totais (Figura 2) e com aumentos nas concentrações de NH₄⁺ livre (Figura 2), proteínas solúveis (Figura 3) e aminoácidos livres totais (Figura 3) principalmente Pro (Figura 4). Neste caso, a significativa redução observada

na atividade de RN, por efeito do NaCl (Figura 1) sugere, de acordo com Ramanjulu et al. (1994) que o NH₄⁺ livre acumulado em condições de estresse salino é produzido não pela rápida redução de NO₃⁻, mas por meio da ação de enzimas proteolíticas.

Nas raízes, por outro lado, não se observou efeito dos fatores tempo e salinidade com relação às concentrações de proteínas solúveis totais ao longo dos 8 dias de tratamento (Figura 3) e, nesta parte da planta, as concentrações de aminoácidos livres totais e Pro foram mantidas próximas àquelas observadas nas plantas-controle (Figuras 3 e 4). Ressalta-se que os acréscimos nas concentrações dessas frações nitrogenadas, nas folhas das plantas de cajueiro tratadas com NaCl, foram associados a aumentos significativos na atividade de GS e com decréscimos lineares no conteúdo de N total, particularmente a partir do 4º dia de tratamento (Figuras 1, 3 e 4). Tem-se sugerido que aumentos no “pool” de aminoácidos livres em condições de estresse salino parece ser um mecanismo de prevenção à acumulação de NH₄⁺ livre em níveis tóxicos na planta (Gouia et al., 1994; Klobus et al., 1998). Ademais, há evidências de que as enzimas aspartato aminotransferase (AAT) e alanina aminotransferase (ALAT) também mediam a utilização do

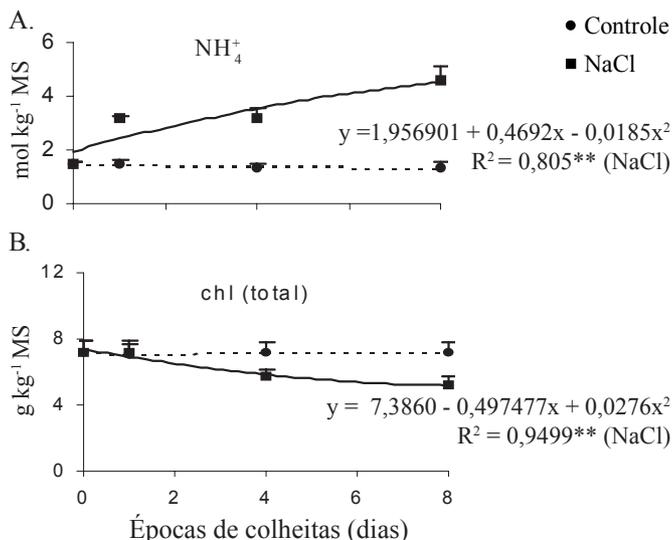


Figura 2. Concentrações de NH₄⁺ e clorofilas (chl) totais em folhas de plantas de cajueiro cultivadas sem (controle) ou com 100 mmol L⁻¹ de NaCl

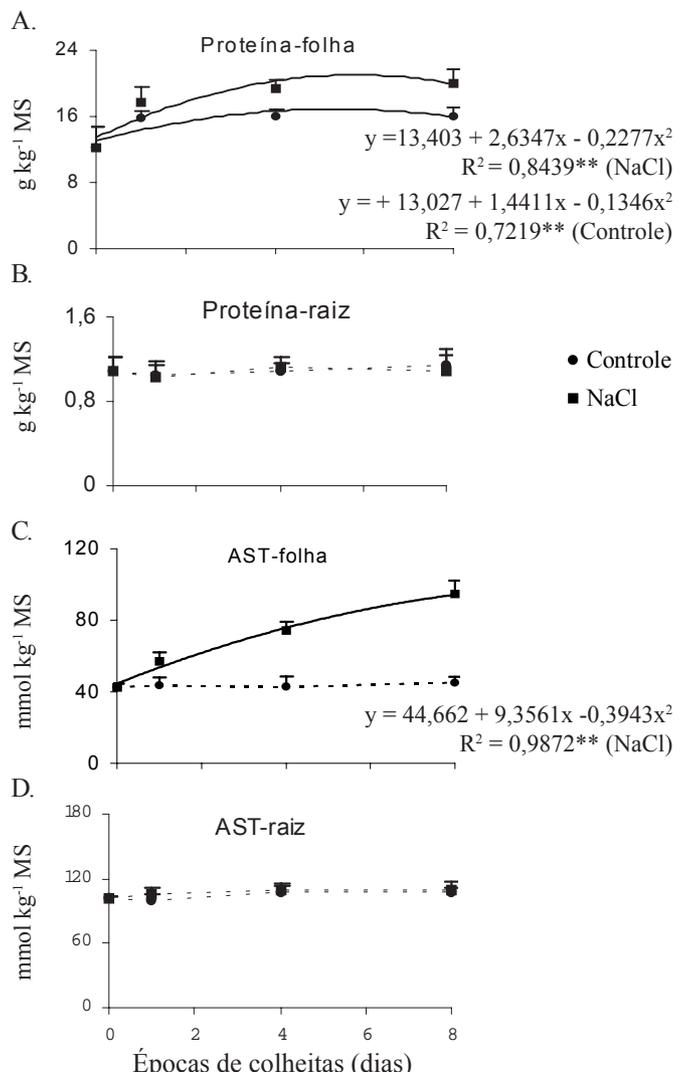


Figura 3. Concentrações de proteínas e aminoácidos solúveis totais (AST) em plantas de cajueiro cultivadas sem (controle) ou com 100 mmol L⁻¹ de NaCl

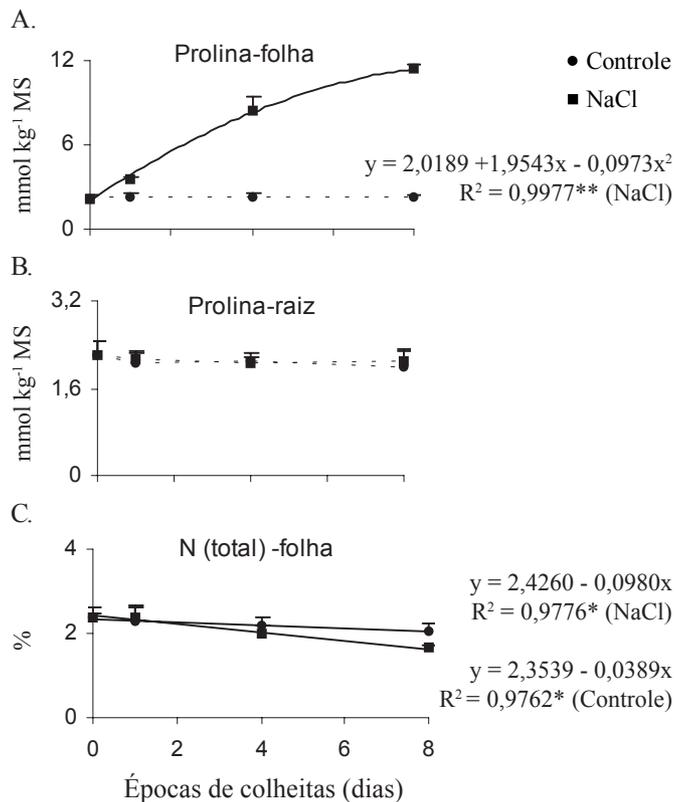


Figura 4. Concentrações de prolina livre e N total em plantas de cajupuro cultivadas sem (controle) ou com 100 mmol L⁻¹ de NaCl

excesso de NH₄⁺ livre convertendo cetoácidos em aminoácidos (Ramanjulu et al., 1994). Há, na literatura, por outro lado, inúmeras evidências que apontam as reações mediadas pela via GS-GOGAT como única rota de incorporação da NH₄⁺ em proteínas nas plantas superiores (Lea, 1997).

Além disso, parece haver um relacionamento entre a acumulação de compostos nitrogenados, principalmente Pro, e a atividade fotorrespiratória (Silveira et al., 1998). Aumentos no conteúdo de Pro, em resposta ao tratamento com NaCl, não têm sido completamente explicados no nível metabólico (Berteli et al., 1995). Acredita-se que o NH₄⁺ formado na fotorrespiração e, também, aquele oriundo do processo de senescência, sejam reassimilados via GS, no citosol, produzindo glutamina (Lea, 1997; Silveira et al., 1998) que nos cloroplastos seria convertida em glutamato via glutamato sintase (Kumar & Abrol, 1990). Geralmente, nas plantas superiores, tanto o glutamato quanto a ornitina são reconhecidos como possíveis precursores de Pro (Delauney et al., 1993); entretanto, em condições de estresse salino o glutamato é o mais provável precursor de Pro em plantas adultas (Berteli et al., 1995; Roosens et al., 1998).

Tem-se sugerido que a biossíntese de Pro em condições de estresse salino e de hídrico, envolve indução ou ativação das enzimas (P5CR e P5CS) (Roosens et al., 1998), decréscimo na oxidação de Pro até glutamato (Elthon & Stewart, 1982), redução da utilização de Pro na síntese de proteínas (Stewart, 1981) e aumento no “turnover” de proteínas (Ramanjulu et al., 1994). Contrariamente, entretanto, tem-se sugerido, também, que aumentos no nível de Pro livre e de outros compostos nitrogenados, em condições de estresse, são sintomas que

resultam de desequilíbrios no metabolismo geral da planta (Silveira et al., 1998) sendo esta última hipótese bastante plausível e de acordo com os resultados encontrados neste estudo.

CONCLUSÕES

1. A salinidade provoca reduções na atividade de redutoras de nitrato, inicialmente, através de efeitos osmóticos indiretos, induzindo decréscimos na transpiração.

2. O aumento da atividade de glutamina sintetase nas folhas foi indiretamente relacionado à salinidade através da indução precoce do processo de senescência e por aumentos no suprimento de NH₄⁺.

3. O aumento na concentração de prolina nas folhas das plantas de cajupuro em resposta à salinidade, não decorreu apenas da assimilação primária de NH₄⁺, mas de uma disponibilidade maior de NH₄⁺ e glutamato, resultantes do processo de catabolismo de proteínas e de aminoácidos.

LITERATURA CITADA

- Bates, I.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.39, p.205-207, 1973.
- Beevers, L.; Hageman, R.H. In: Lauchi, A.; Bielecki, R.L. (eds), *Encyclopedia of plant physiology*. v.15 A. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 151-197.
- Berteli, F.; Corrales, E.; Guerrero, C.; Ariza, M.J.; Pilego, F.; Valpuesta, C. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v. 93, p. 259-264, 1995.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, Memphis, v.72, p.246-254, 1976.
- Delauney, A.J.; Hu, C.A.A.; Kavi Kishor, P.B.; Verma, D.P.S. Cloning of delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *Journal of Biology and Chemistry*, Dallas, v.268, p.18673-18678, 1993.
- Elthon, T.E.; Stewart, C.R. Proline oxidation in corn mitochondria. *Plant Physiology*, Rockville, v. 70, p. 567-572, 1982.
- Gouia, H.; Hhorbal, M.H.; Touraine, B. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on nitrate reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt tolerant cotton. *Plant Physiology*, Rockville, v. 105, p.1409-1418, 1994.
- Greenway, H.; Munns, R. Mechanism of salt tolerance in non-halophytes. *Plant Physiology*, Rockville, v.31, p.149-190, 1980.
- Hageman, R.H.; Hucklesby, D.P. Nitrate reductase from higher plants. *Methods in enzymology*, San Diego, v.17 A, p.491-503, 1971.

- Klobus, G.; Ward, M.R.; Huffaker, R.C. Characteristics of injury and recovery of net nitrate transport of barley seedlings from treatments of NaCl. *Plant Physiology*, Rockville, v. 87, p. 878-882, 1998.
- Kumar, P.A.; Abrol, Y.P. Ammonia assimilation in higher plants. In: Abrol, Y. P.; John, N. P. (eds.). *Nitrogen in higher plants*. New York: John Wiley Sons Inc., 1990. p.159-173.
- Lea, P.J. Primary nitrogen metabolism. In: Dey, P.M.; Harbone, J.B. (eds.). *Plant biochemistry*. San Diego: Academic Press, 1997. p. 273-306.
- Lea, P.J.; Leegood, R.C. *Plant biochemistry and molecular biology*. 1. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 1994, 210p.
- Liu, J.; Zhu, J.K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, Rockville, v.114, p.591-596, 1997.
- Meneses Junior, J. Expressão de caracteres fisiológicos induzidos por estresse salino em três genótipos de cajueiro. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2002, 180p. Tese Doutorado
- Miflin, B.J.; Lea, P.J. Ammonia assimilation. In: Miflin, B.J. (ed.) *The biochemistry of plants*. New York: Academic Press, 1980. cap. 5, p.169-202.
- Munns, R.; Termaat, A. Whole plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, Sidney, v.13, p.143-160, 1986.
- Nabil, M.; Coudert, A. Effects of sodium chloride on growth, tissue elasticity and solute adjustment in two *Acacia nilotica* subspecies. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v.93, p. 217-224, 1995.
- Ramanjulu, S.; Veeranjanyulu, K.; Sudhanar, C. Short-term shifts in nitrogen metabolism in mulberry (*Morus alba*) under salt shock. *Plant Physiology*, Rockville, v.45, p.991-995, 1994.
- Rao, K.R.; Gnanam, A. Inhibition of nitrate reductase activity by salinity stress in *Sorghum vulgare*. *Phytochemistry*, Melbourne, v.29, p.1047-1049, 1990.
- Redinbaugh, M.G.; Campbell, W. H. Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v. 82, p. 640-650, 1991.
- Rhodes, A.S.; Handa, S. Amino acid metabolism in relation to osmotic adjustment in plant cell. In: Cherry, J.H. (ed), *Environmental stress in plants*, Berlin: 1989, p.41-62.
- Rhodes, A.S.; Handa, S.; Bressan, R.A. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiology*, Rockville, v. 82, p.890-903, 1986.
- Robinson, S.A.; Slade, A.P.; Fox, G.G.; Phillips, R.G.R.; Stewart, G.R. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiology*, Rockville, v.95, p.509-516, 1991.
- Roosens, N.H.C.J.; Thu, T.T.; Iskander, H.M.; Jacobs, M. Isolation of the ornithine-d-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, Rockville, v.117, p.263-271, 1998.
- Siddiqui, M.Y.; King, B.J.; Glass, A.D. M. Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity. *Plant Physiology*, Rockville, v.100, p. 644-650, 1992.
- Silveira, J.A.G.; Matos, J.C.S.; Ceccato, V.M.; Sampaio, A.H.; Costa, R.C.L.; Viégas, R.A. Induction of nitrate reductase activity and nitrogen fixation in two *Phaseolus* species in relation to exogenous nitrate level. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, New Delhi, v. 4, p.19-26, 1998.
- Stewart, C.R. Proline accumulation: Biochemical aspects. In: Paleg, L.G.; Aspinall, D. (eds.), *Physiology and biochemistry of drought resistance in plants*, Sydney: Academic Press, 1981, Cap. 2, p. 243-259.
- Viégas, R. A.; Silveira, J.A.G. Activation of nitrate reductase of cashew leaf by exogenous nitrite. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Campinas, v.14, p.39-44, 2002.
- Wallsgrove, R.M.; Turner, J.C.; Hall, N.P.; Kendall, A.C.; Bright, S.W.J. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase-biochemical and genetic analysis. *Plant Physiology*, Rockville, v.83, p.155-158, 1987.
- Whitham, F.H.; Blaydes, D.F.; Devlin, R.N. Experiments in plant physiology. 1. ed. New York: D. van Nostrame Company, 1971, p. 55-88.