

Salinidade modula negativamente a absorção e assimilação de NO_3^- em plantas de feijão de corda¹

Salinity modulates negatively nitrate uptake and assimilation in cowpea plants

Rafael Magalhães de Aragão², Jamille Santos da Silva³, Cristina Silva de Lima² e Joaquim Albenísio Gomes Silveira^{4*}

Resumo - Realizou-se um estudo sobre a absorção e assimilação de NO_3^- em plantas de feijão de corda com o objetivo de analisar como os dois processos se relacionam frente a condições de salinidade, bem como, esclarecer possíveis mecanismos de modulação das plantas sob estresse salino. Plantas com 14 dias, crescidas em solução nutritiva (Sem NH_4^+), foram submetidas a KNO_3 e NaCl 100 mM por dez dias. Avaliou-se a absorção e o conteúdo de NO_3^- , atividade da Redutase do Nitrato (RN), transpiração, proteínas solúveis e aminoácidos livres totais (ALT). A aplicação do NaCl resultou na redução da absorção líquida e no conteúdo de NO_3^- , principalmente, em raízes. A redução da atividade da RN foi positivamente correlacionada com a redução da transpiração, mas nenhuma relação foi estabelecida com a redução nos níveis e proteínas solúveis, que foi mais eminente em raízes. Os níveis de ALT foram superiores em raízes de plantas controle e tratadas com NaCl . Os resultados indicam um possível mecanismo de modulação devido a menores níveis de proteínas e maiores níveis de ALT em raízes sob condições de salinidade. Em resumo, a salinidade modula negativamente a absorção e assimilação de NO_3^- em plantas de feijão de corda, a princípio pela redução nos níveis de proteínas solúveis e pelo acúmulo de aminoácidos em raízes, e a inibição do tipo não-competitiva pelo NaCl indica que a competição entre NO_3^- e Cl^- pelos sítios de absorção não é o fator mais limitante para modular a absorção no NO_3^- .

Palavras-chave - Aminoácidos livres totais. Estresse salino. Nitrogênio. *Vigna unguiculata*.

Abstract - This present work aims to perform a study on the NO_3^- uptake and assimilation in cowpea plants, analyzing how the two processes are related front to salinity conditions and clarify possible mechanisms of plant modulations under salt stress. Plants with 14 days old grown in nutrient solution (Absence NH_4^+) were subjected to KNO_3 10 mM and NaCl 100 mM for ten days. Was evaluated NO_3^- net uptake and content, nitrate reductase activity (RN), transpiration, soluble proteins and total free amino acids (ALT). Application of NaCl resulted in reduced net uptake and the content of NO_3^- , mainly in roots. The reduction of NR activity was positively correlated with the reduction of transpiration, but no relation was established with the reduction in the soluble proteins levels, which was more conspicuous on roots. ALT levels were higher in roots of control plants and treated with NaCl . The results indicate a possible mechanism of modulation due to lower protein levels and higher ALT levels in roots under saline conditions. In summary, salinity modulates the uptake and assimilation of NO_3^- in cowpea plants, in principle, by the reduction in the soluble proteins and amino acids accumulation in roots and the non-competitively inhibition by NaCl indicates that competition between NO_3^- and Cl^- by the sites is not the most limiting factor to modulate the NO_3^- uptake.

Key words - Total free amino acids. Salt stress. Nitrogen. *Vigna unguiculata*.

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 31/08/2010; aprovado em 31/01/2011

Trabalho submetido e selecionado no primeiro Simpósio Brasileiro de Salinidade realizado de 12-15/10/2010 em Fortaleza, Ceará, Brasil; Pesquisa financiada pelo CNPq

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte, S/N, Campus do Pici, Fortaleza-CE, Brasil, 60.455-970, rafael.aragao@yahoo.com.br, crysz.@gmail.com

³Graduada em Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte, S/N, Campus do Pici, Fortaleza-CE, Brasil, 60.455-970, jamille_agronomia@yahoo.com.br

⁴Departamento de Bioquímica de Biologia Molecular, Bolsista do CNPq, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte, S/N, Campus do Pici, Fortaleza-CE, Brasil, 60.455-970, silveira@ufc.br

Introdução

A salinidade é um dos principais fatores ambientais que mais limita o crescimento e a produtividade das plantas. Este fator é mais expressivo nas regiões áridas e semiáridas, as quais apresentam grandes contrastes ambientais (MUNNS; TESTER, 2008; PARIDA; DAS, 2004). O excesso de sais causa, dentre outros, como um dos efeitos, redução no potencial hídrico dos tecidos vegetais, provocando restrição no crescimento uma vez que as taxas de alongação e de divisão celular dependem diretamente do processo de extensibilidade da parede celular (ASHRAF; HARRIS, 2004). Além disso, o excesso de sais afeta negativamente os processos de absorção e assimilação de nutrientes pelas plantas, principalmente o íon nitrato (NO_3^-), que é a principal fonte de nitrogênio em solos agrícolas e o que mais frequentemente limita o crescimento de plantas (ARAGÃO et al., 2010; MELONI et al., 2004).

O NO_3^- é responsável por uma série de reações moleculares que regulam sua própria absorção e, subsequentemente, a sua redução pela atividade da enzima redutase do nitrato (RN) que catalisa a primeira etapa da assimilação do nitrato e é dependente do fluxo deste mesmo íon pelas raízes (CARILLO et al., 2005; PARIDA; DAS, 2004). Estudos demonstraram que a assimilação de NO_3^- em plantas é afetada sob condições de salinidade, sendo que essas alterações estariam associadas a uma reduzida absorção deste íon ou, ainda, à competição existente entre NO_3^- e Cl^- (DEBOUBA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2001). Baixas taxas de assimilação de NO_3^- podem induzir a planta a exportar mais do NO_3^- absorvido pelas raízes para a parte aérea, onde é reduzido e incorporado em aminoácidos. Estes aminoácidos formados na parte aérea podem ser translocados para as raízes através do floema, promovendo uma regulação pelo mecanismo denominado “efeito feedback” (FORDE; LEA, 2007).

A regulação por feedback é potencialmente mediada através de pools de aminoácidos entre raiz e parte aérea e é considerado um sinal para o status de N na planta (NAZOA, 2003). Uma vez acumulado internamente ou fornecido externamente, os aminoácidos podem regular a absorção de nitrato e os sistemas de redução (SURABHI et al., 2008). No entanto, poucos estudos reportam como os processos de absorção e assimilação de NO_3^- se modulam conjuntamente com condições de salinidade.

Em virtude de o nitrogênio ser o elemento mais abundante no tecido vegetal, o que reflete na sua alta exigência pelas culturas e pelo aspecto de que a absorção de NO_3^- pelas plantas é extremamente afetada pela salinidade, o presente trabalho realizou um estudo sobre a absorção e assimilação de NO_3^- em plantas de feijão de corda com o objetivo de analisar como

os dois processos se relacionam frente a condições de salinidade, bem como, esclarecer possíveis mecanismos de modulação das plantas sob estresse salino.

Material e métodos

Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] cultivar Pitiúba foram germinadas sob condições controladas em sistema de rolo de papel germitest e desinfetadas com NaClO 0,2% (m/v) por 5 min, sob agitação eventual (VIEIRA; CARVALHO, 1994). Após quatro dias de germinação, as plântulas em estágio de gancho plumular, foram transferidas para vasos contendo solução nutritiva com modificações (sem NH_4^+) (HOAGLAND; ARNON, 1950). Com dez dias, renovou-se a solução nutritiva para uma concentração fixa de 10 mM de NO_3^- ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4 mM + KNO_3 6 mM) monitorada diariamente e ajustada para 10 mM quando necessário. O tratamento salino foi feito pela adição de NaCl 100 mM (-0,45 MPa) em solução. O período de tratamento com NaCl teve uma duração de dez dias e as determinações foram realizadas a cada dois dias (2; 4; 6; 8 e 10 dias). Durante período de tratamento, a cada dois dias, foram analisadas a absorção e conteúdo de NO_3^- em folhas e raízes, a atividade da redutase do nitrato - RN, as proteínas solúveis e os aminoácidos livres totais - ALT. Para eliminar a interferência do meio externo, as plantas foram crescidas em câmara de crescimento (Phytotron) com temperatura de 27 °C, UR 70%, PAR 550 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Absorção líquida de nitrato através de eletrodo seletivo

Plantas de feijão de corda foram crescidas por sete dias em solução nutritiva diluída 4x (HOAGLAND; ARNON, 1950). Durante os três primeiros dias, a solução foi mantida com todos os nutrientes, exceto NH_4^+ . Nos outros quatro dias, a solução foi renovada e retirada às fontes de NO_3^- e NH_4^+ , objetivando uma deficiência de N. Ao fim de sete dias, as raízes foram destacadas e lavadas em CaCl_2 0,1 mM por 20 minutos, eliminando o excesso de NO_3^- apoplástico. Em seguida, cada raiz foi transferida para erlenmeyers contendo 25 mL de meio de incubação MES-Tris 2 mM + CaCl_2 0,1 mM + KNO_3 (2; 4; 6; 8 e 10 mM), por um período de 60 minutos, e o tratamento salino foi obtido pela adição de NaCl 100 mM no meio de incubação. A absorção de NO_3^- foi mensurada pela sua depleção no meio de incubação, que foi quantificada a partir do uso de um eletrodo seletivo de NO_3^- (Seven multi, marca Mettler Toledo®). Assim, o eletrodo foi imerso na solução de incubação após prévia calibração do aparelho

com as concentrações estabelecidas de KNO_3 . O eletrodo foi configurado para expressar as leituras na forma direta de $\text{mmol de NO}_3^- \text{L}^{-1}$.

Concentração de nitrato em folhas e raízes

Amostras de folhas e raízes secas por liofilização foram submetidas à extração com água destilada desionizada a 100°C por 30 minutos. Após centrifugação por 10 min a $5.000 \times g$, alíquotas do extrato foram utilizadas para quantificar a concentração de nitrato conforme descrito por Cataldo et al. (1975). A concentração de nitrato em tecido foi obtida a partir de uma curva padrão com concentrações crescentes de KNO_3 . Os resultados foram expressos em $\text{mmol de NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ de massa seca (MS) do tecido.

Atividade da redutase do nitrato em folhas

Amostras de discos foliares com diâmetro de 10 mm e massa de, aproximadamente, 100 mg de tecido vegetal foram acondicionadas em tubos de ensaio tipo “vacutiner”. Os tubos foram hermeticamente fechados e protegidos da luz. Em seguida, procedeu-se a realização de vácuo, com auxílio de uma bomba de sucção por 2,5 minutos, de forma a produzir no interior dos tubos de ensaio um ambiente anaeróbico. A atividade da RN foi mensurada por espectrofotometria (540 nm), a partir da formação de NO_2^- no meio de reação, por meio de uma curva padrão ajustada com concentrações crescentes de NaNO_2 (HAGEMAN; HUCKLESBY, 1971).

Análise de aminoácidos solúveis totais (N- α -amino)

A concentração dos aminoácidos livres totais foi determinada pelo método de Peoples et al. (1989). Amostras de folhas e raízes previamente liofilizadas foram submetidas à extração com água destilada desionizada, a 100°C por 30 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a $5.000 \times g$, por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e o precipitado foi suspenso novamente. A reação para dosagem de aminoácidos livres totais foi conduzida em tubos de ensaio contendo uma alíquota de 0,1 mL de extrato, em presença de 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 ($\text{KCN } 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$; e ninhidrina 5% em methoxy etanol) e 4,0 mL de água destilada. Após a homogeneização, os tubos, hermeticamente fechados, foram acondicionados em banho Maria, a 90°C , por um período de 15 minutos. Paralisou-se a reação por meio de uma abrupta redução da temperatura do meio de reação, mediante contato dos tubos de ensaio com água, a 2°C . As leituras foram feitas em espectrofotômetro (570 nm) e os teores de aminoácidos livres totais foram quantificados pela construção de uma reta padrão

ajustada a partir de concentrações crescentes de uma mistura padronizada de L-asparagina e L-glutamina.

Concentração de proteínas solúveis

Para a determinação das proteínas solúveis totais em tecidos de folhas e de raízes utilizou-se o método descrito por Bradford (1976). Amostras frescas de folhas e raízes foram submetidas a uma extração a quente por 30 minutos, a 100°C , numa proporção de dez discos de folhas de 10 mm de diâmetro ou 100 mg de raízes para cada 5 mL de água deionizada. As concentrações das proteínas solúveis totais foram calculadas com base em uma curva padrão ajustada a partir de doses crescentes de albumina de soro bovino (BSA) p.a (Sigma), a 595 nm, em espectrofotômetro modelo Spectronic 20 Genesys 5.

Delineamento estatístico e análise dos dados

O primeiro experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial (2×5), representando dois níveis de NaCl (0 e 100 mM) e cinco dias de tratamento (2; 4; 6; 8 e 10 dias), com quatro repetições. Os dados foram submetidos ao teste F a 5% de significância, através de análise de variância e as médias comparadas com base no teste de Tukey. Para a absorção líquida de nitrato, utilizou-se um esquema fatorial também de 2×5 , com o primeiro fator representando os tratamentos salinos e o segundo fator os níveis de KNO_3 no meio de incubação.

Resultados e discussão

A absorção líquida de NO_3^- em raízes sob condições de salinidade induzida pelo NaCl 100 mM foi reduzida em 44%, em comparação ao controle (FIG. 1A). As constantes cinéticas mostraram que os valores para K_m foram similares, porém os valores de V_{max} foram maiores sob condições normais de crescimento, o que evidenciou uma inibição do tipo não-competitiva com o NaCl 100 mM, conforme o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (FIG. 1B). Semelhantes respostas para K_m e V_{max} foram obtidos com a mesma cultivar tratada com NaCl 100 mM, confirmando uma possível inibição não-competitiva (ARAGÃO, 2008).

O conteúdo de NO_3^- em folhas e raízes de feijão de corda apresentou um acúmulo progressivo durante o período de exposição ao KNO_3 10 mM. Na condição controle, o conteúdo em folhas e raízes acumulou aproximadamente quatro vezes, sendo o acúmulo de NO_3^- em raízes, em média, 1,8 vezes maior que em folhas (FIG. 2). Sob condições de salinidade, o conteúdo

de NO_3^- em folhas foi significativamente menor somente no oitavo e décimo dia (FIG. 2A). Em raízes, o efeito do NaCl induziu uma diferença significativa durante todo o período de tratamento (FIG. 2B). É interessante observar que em folhas, a diferença do conteúdo de NO_3^- entre tratamentos (controle e NaCl 100 mM) aumentou com o tempo de exposição e em raízes este comportamento foi inverso, diminuindo gradativamente com o tempo de exposição ao NaCl, mesmo com os níveis de NO_3^- monitorados diariamente e ajustados para a concentração de 10 mM quando necessário. Semelhante aos nossos resultados, um maior acúmulo no conteúdo de NO_3^- foi observado em raízes de ervilhas e a exposição a uma concentração moderada de NaCl (30 mM) diminuiu o acúmulo de NO_3^- na parte aérea, mas nenhuma relação foi estabelecida com o maior acúmulo em raízes (FRECHILLA et al., 2001). Em plantas de tomate tratadas com NaCl 100 mM por dez dias, o conteúdo de NO_3^- foi decrescente tanto em folhas quanto raízes, mesmo sob condições normais de crescimento, porém, os níveis de NO_3^- foram renovados a cada três dias (DEBOUBA et al., 2006). Adicionalmente, comparando-se as respostas para a cinética de absorção de NO_3^- e o conteúdo NO_3^- sob condições de salinidade, verifica-se uma diferença de aproximadamente 15% entre o NO_3^- absorvido e o acumulado, o que pode indicar que a competição entre

NO_3^- e Cl^- não seja o fator mais limitante para absorção no NO_3^- .

A atividade da redutase do nitrato (RN) foi reduzida pelo tratamento salino durante todo o período experimental. Em média, a redução pelo NaCl 100 mM foi de 19% (FIG. 3A). Como esperado, a atividade desta enzima é reduzida sob condições de estresse salino (LOBATO et al., 2009; SILVEIRA et al., 2001). No entanto, essas respostas sempre estão relacionadas com fatores tais como concentração e fluxo de nitrato e luminosidade, além de outros fatores tais como transpiração, temperatura e umidade (ARAGÃO et al., 2010; MELONI et al., 2004; VIÉGAS; SILVEIRA, 1999). No caso da transpiração, os resultados demonstraram que sob condições de salinidade, esta redução parece ser proporcional ao da atividade RN, que foi reduzida em 15% durante o período experimental (FIG. 3B). Assim, esse resultado mostrou um comportamento proporcional aos dados da atividade da RN. Desta forma, uma correlação positiva estabelecida entre transpiração e atividade da RN apresentou $R^2 = 0,892$ (dados não mostrados).

O conteúdo de proteínas solúveis em folhas controle aumentou rapidamente durante os dois primeiros dias de exposição ao KNO_3 10 mM. Em seguida, observou-se uma fase linear até o quarto dia, seguida novamente de um aumento até o décimo dia. Na média

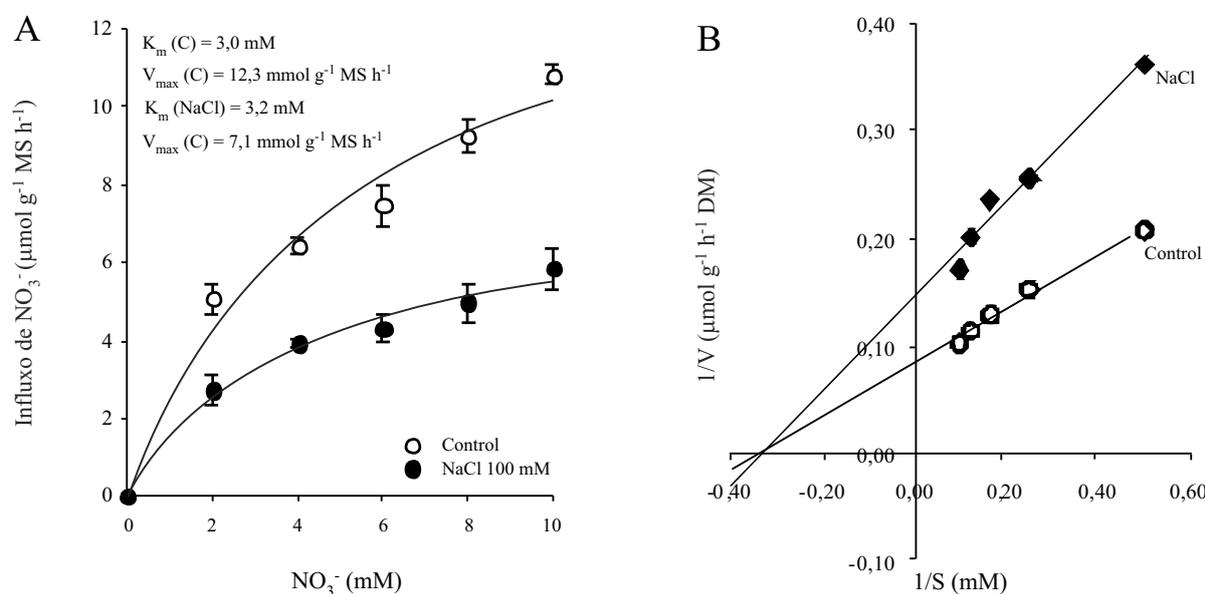


Figura 1 - Cinética da absorção líquida de NO_3^- e constantes cinéticas K_m e V_{max} de raízes de feijão de corda expostas a condições de salinidade por NaCl 100 mM. As constantes cinéticas (A) foram obtidas a partir da equação de Michaelis-Menten. Para isso, utilizou-se o software Sigma-Plot 10 para ajustar as curvas para uma hipérbole retangular. O gráfico Duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (B) indica uma competição do tipo não-competitiva com a aplicação de NaCl 100 mM

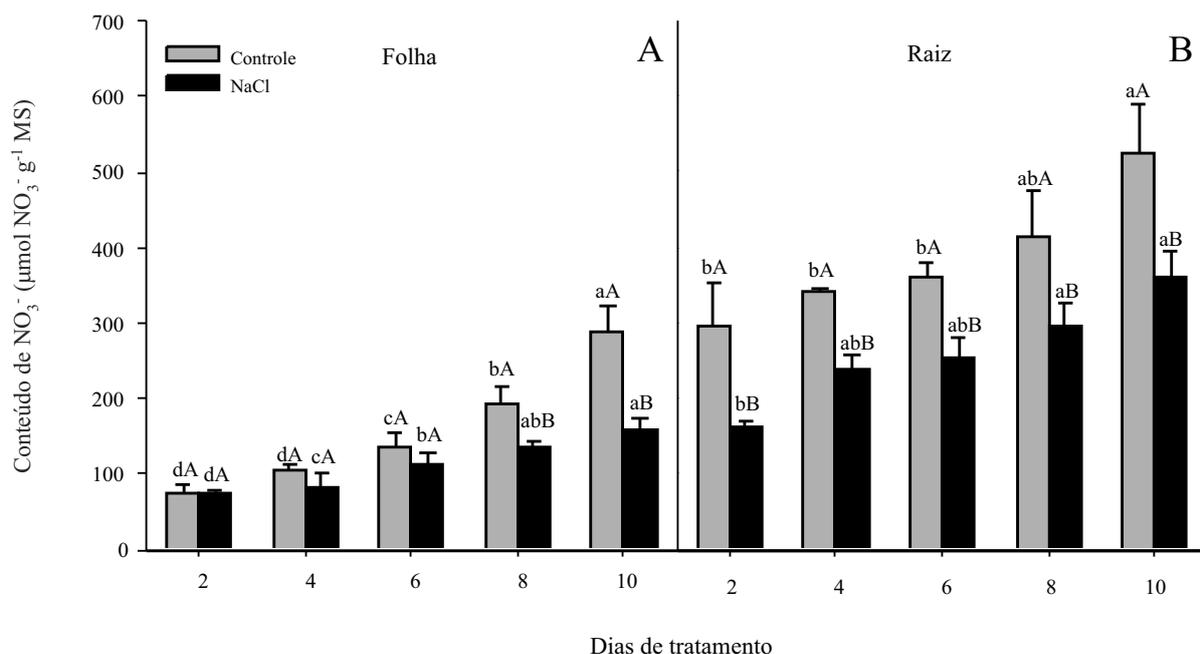


Figura 2 - Conteúdo de NO_3^- em folhas e raízes de plantas de feijão de corda crescidas por dez dias na ausência (Controle) ou presença (NaCl) de NaCl 100 mM. Diferentes letras minúsculas representam a diferença estatística no tratamento e diferentes letras maiúsculas representam a diferença estatística entre tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,05$)

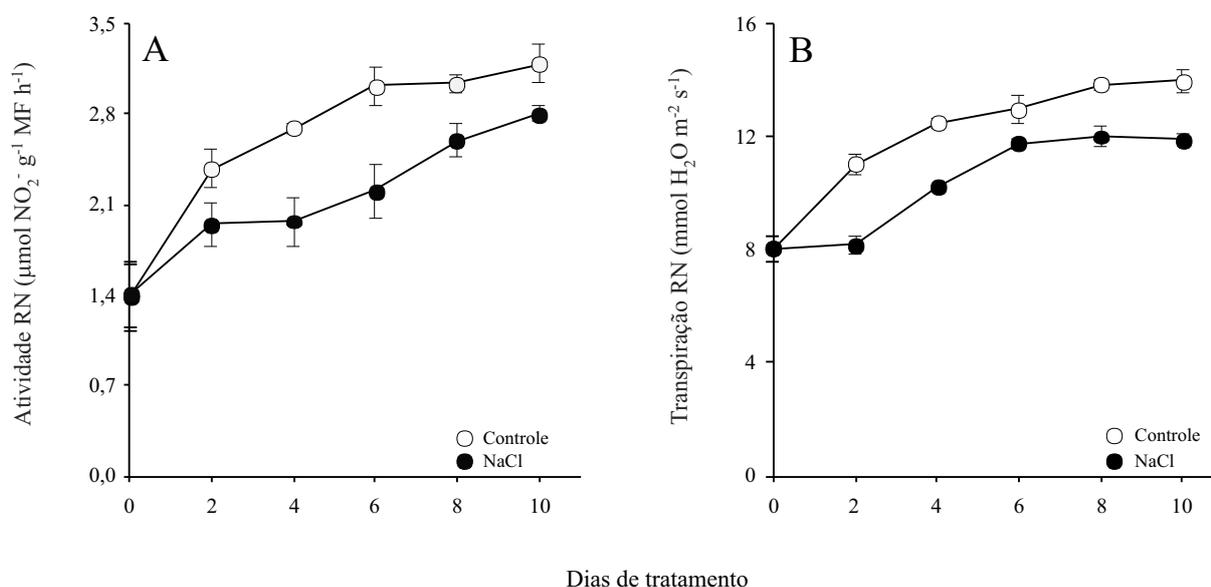


Figura 3 - Dados da atividade da redutase do nitrato - RN (A) e transpiração (B) em folhas de plantas de feijão de corda crescidas por dez dias na ausência (Controle) ou na presença (NaCl) de NaCl 100 mM. As barras indicam o desvio padrão

calculada, o incremento de proteínas solúveis foi de duas vezes. Diferentemente, o tratamento com NaCl mostrou uma fase linear até o oitavo dia e, posteriormente, um

discreto aumento foi observado até o décimo dia. Durante este período, o incremento foi de aproximadamente 1,3 vezes e 35% menor que a condição controle (FIG. 4A).

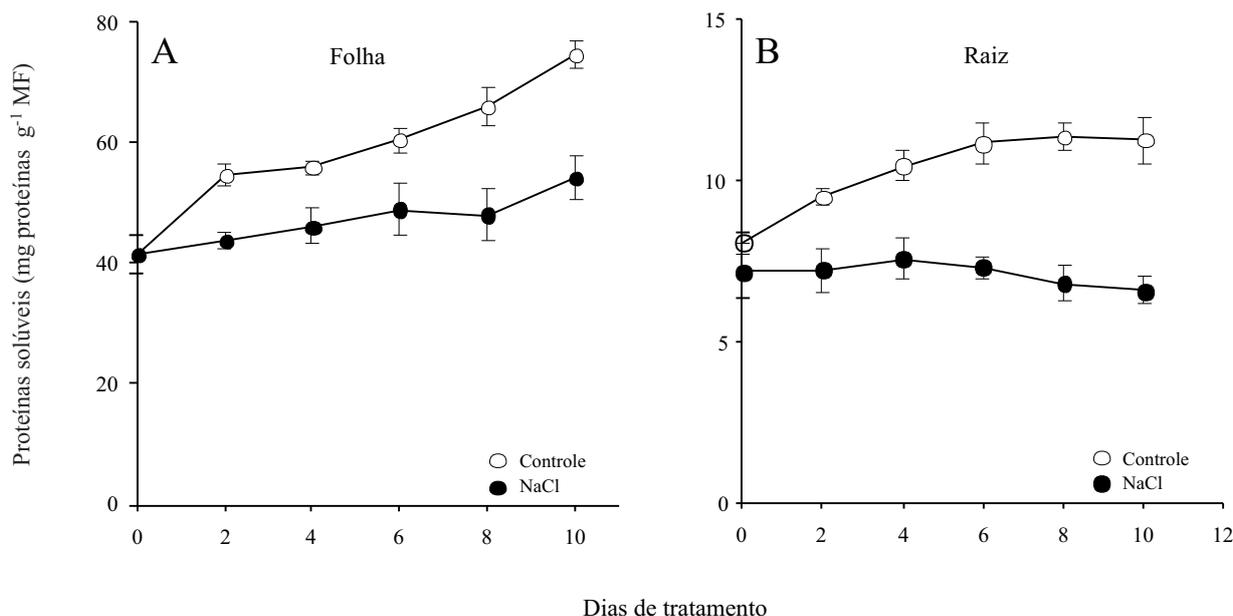


Figura 4 - Conteúdo de proteínas solúveis em folhas (A) e raízes (B) em plantas de feijão de corda crescidas por dez dias na ausência (Controle) ou presença de NaCl 100 mM (NaCl). As barras indicam o desvio padrão

Em raízes de plantas controle o conteúdo de proteínas solúveis aumentou gradativamente até por volta do sexto dia, seguido de um discreto declínio. Este incremento foi de aproximadamente 1,4 vezes. Para as raízes de plantas tratadas com NaCl observou-se um comportamento linear sem incremento (FIG. 4B).

Apesar dos efeitos da salinidade sobre o conteúdo de proteínas solúveis evidenciarem apenas reduções em comparação ao controle, pode-se observar que estas reduções foram mais evidentes em raízes do que em folhas. Isto sugere que plantas de feijão de corda submetidas à salinidade são dependentes de síntese protéica, proveniente do metabolismo do N, assim como proposto por Frechilla et al. (2001), acarretando no menor desenvolvimento da planta. Entretanto, o pequeno volume de raízes pode também ser o responsável por este comportamento. No entanto, estas respostas parecem variar em função da espécie, como no caso do trigo, onde se observou um comportamento contrário, promovendo um aumento nos níveis de proteínas solúveis em resposta ao NaCl, sendo maior que as crescidas sob condições normais (CARILLO et al., 2005).

A concentração de aminoácidos livres totais (ALT) sob condições normais de crescimento aumentou em pequenas proporções para folhas e raízes, mas de forma significativa. O mesmo comportamento

foi observado para o tratamento com NaCl (FIG. 5). No entanto, tanto em folhas quanto em raízes, os níveis de ALT sob condições de salinidade diferiram significativamente da condição controle durante todo o período de tratamento. Em condições de salinidade, um maior acúmulo de ALT foi verificado em raízes. Em plantas de cajueiro, os níveis de aminoácidos em folhas foi superior comparado às raízes e, estes aumentos foram associados com o acúmulo de prolina nas folhas (SILVEIRA et al., 2003). Além disso, os níveis de proteínas foram maiores em raízes expostas ao NaCl 100 mM, o que foi também oposto aos dados de feijão de corda. Comparativamente ao caju, os resultados para feijão de corda demonstraram uma relação inversa, mesmo sob condições de salinidade. Tais condições induziram respostas no feijão de corda que pode ser indicativo de um mecanismo diferente de modulação da absorção e assimilação de nitrato pela salinidade. Os maiores acúmulos do conteúdo de NO_3^- e ALT, juntamente com menores níveis de proteínas solúveis em raízes, podem indicar a existência de uma regulação entre raiz e parte aérea, semelhante ao mecanismo proposto por Glass et al. (2002). Adicionalmente, é válido ressaltar que para estes ensaios, a solução nutritiva estava desprovida de NH_4^+ , o que certamente contribuiria para o aumento dos níveis de ALT e, assim, induziria uma menor absorção e assimilação de NO_3^- .

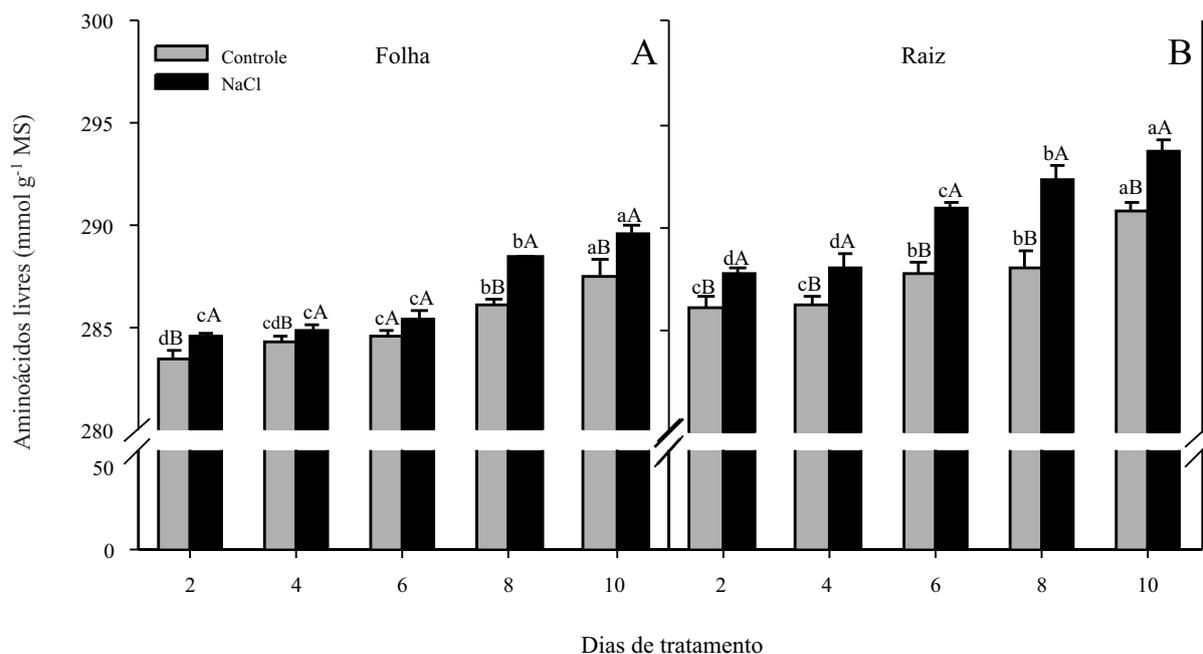


Figura 5 - Conteúdo de aminoácidos livres totais em folhas e raízes de plantas de feijão de corda crescidas por dez dias na ausência (Controle) ou presença de NaCl 100 mM (NaCl). Diferentes letras minúsculas representam a diferença estatística no tratamento e diferentes letras maiúsculas representam a diferença estatística entre tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,05$)

Conclusões

1. A salinidade modula negativamente a absorção e assimilação de NO₃⁻ em plantas de feijão de corda. Essa modulação está positivamente associada com a acumulação de aminoácidos livres, principalmente nas raízes;
2. A inibição do tipo não-competitiva causada por NaCl indica que a competição entre NO₃⁻ e Cl⁻ pelos sítios de absorção não é o fator mais limitante para modular a absorção no NO₃⁻.

Referências

ARAGÃO, R. M. **Mecanismos cinéticos de inibição da absorção de nitrato em raízes de feijão-caupi expostas à salinidade**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de plantas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ARAGÃO, R. M. *et al.* Absorção, fluxo no xilema e assimilação do nitrato em feijão-caupi submetido à salinidade. **Revista Ciência Agrônoma**, v. 41, n. 01, p. 100-106, 2010.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, n. 01, p. 3-16, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 246-254, 1976.

CARILLO, P. *et al.* Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 03, p. 209-219, 2005.

CATALDO, D. A. *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic. **Communication Soil Science Plant Analysis**, v. 06, n. 01, p. 71-80, 1975.

DEBOUBA, M. *et al.* NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 12, p. 1247-1258, 2006.

FORDE, B. G.; LEA, P. J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 09, p. 2339-2358, 2007.

FRECHILLA, S. *et al.* Pea responses to saline stress is effected by the source of nitrogen nutrition (ammonium or nitrate). **Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 02, p. 171-179, 2001.

GLASS, A. D. M. *et al.* The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53, n 370, p. 855-864, 2002.

HAGEMAN, R. H.; HUCKLESBY, D. P. Nitrate reduction from higher plants. **Methods Enzymology**, v. 23, p. 491-503, 1971.

- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 32p.
- LOBATO, A. K. S. *et al.* Morphological, Physiological and Biochemical Responses During Germination of Cowpea (*Vigna unguiculata* Cv. Pitiuba) Seeds Under Salt Stress. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 05, n. 05, p. 590-596, 2009.
- MELONI, D. A. *et al.* The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 16, n. 01, p. 39-46, 2004.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.
- NAZOA, P. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. **Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 03, p. 689-703, 2003.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *Bruguiera parviflora* grown under hydroponic culture. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 08, p. 921-928, 2004.
- PEOPLES, M. B. *et al.* **Methods for evaluating nitrogen fixation by modulated legumes in the field**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1989. 76.p.
- SILVEIRA, J. A. G. *et al.* Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, n.02, p. 171-179, 2001.
- SILVEIRA, J. A. G. *et al.* Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, n. 02, p.115-123, 2003.
- SURABHI, G. K. *et al.* Modulations in key enzymes of nitrogen metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with differential sensitivity to salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, n. 02, p. 171-179, 2008.
- VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Ammonia assimilation and proline accumulation in cashew (*Anacardium occidentale* L.) plants submitted to NaCl-salinity. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 11, n. 02, p. 153-159, 1999.
- VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.