

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

EDUARDO LUIZ VOIGT

TRANSPORTE E HOMEOSTASE  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   
SOB CONDIÇÕES DE SODICIDADE EM FEIJÃO CAUPI

FORTALEZA

2008

EDUARDO LUIZ VOIGT

TRANSPORTE E HOMEOSTASE  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   
SOB CONDIÇÕES DE SODICIDADE EM FEIJÃO CAUPI

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

FORTALEZA

2008

EDUARDO LUIZ VOIGT

TRANSPORTE E HOMEOSTASE  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   
SOB CONDIÇÕES DE SODICIDADE EM FEIJÃO CAUPI

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, Área de Concentração Bioquímica Vegetal.

Aprovada em 30 / 05 / 2008.

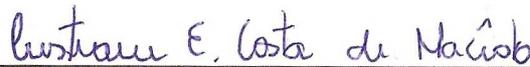
BANCA EXAMINADORA



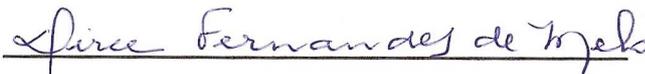
Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará-UFC



Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello  
Universidade de São Paulo-USP



Profa. Dra. Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN



Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo  
Universidade Federal do Ceará-UFC



Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho  
Universidade Federal do Ceará-UFC

Ao meu pai Rolf (em memória) e à minha mãe Crista,  
por terem viabilizado este sonho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, por ter aberto prontamente as portas do LABPLANT desde meu primeiro contato, pela orientação, pelo apoio, pelo incentivo e pela amizade.

Ao Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, como Diretor do Centro de Ciências da UFC, e à equipe do Laboratório de Estresses Bióticos em Plantas, pelos auxílios prestados.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte, como Chefe do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, pelo apoio durante o período no qual fui Professor Substituto e pelos ensinamentos dados nas disciplinas.

À Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos, como Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC durante o início do curso de doutorado, pelo apoio e pelo incentivo.

À Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo e à equipe do Laboratório de Bioenergética, em especial ao Helio, Alana e Luciana, pela amizade, pelo incentivo, pela confiança e pelos exemplos.

Ao Prof. Dr. Benildo de Souza Cavada e à equipe do BIOMOL, em especial ao Rodrigo Maranguape, pelo apoio, pelo incentivo e pelos auxílios.

Aos Professores Dr. Joaquim Enéas e Enéas Gomes, pelos ensinamentos dados nas disciplinas e pelos auxílios prestados.

Aos Professores Dr. Francisco Campos, Dra. Norma Maria Barros Benevides, Dr. Márcio Viana Ramos, Dra. Ana Cecília Horta, Dr. Thalles Barbosa Granjeiro, por todos os ensinamentos e auxílios prestados.

Às Professoras Dra. Maria Raquel Miranda e Dra. Cristina Paiva, pela amizade, pelo incentivo, pelo apoio e pelos auxílios.

À Profa. Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo, pela amizade, pelo apoio, pelos auxílios, pelas conversas e pelos exemplos.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, pelos auxílios prestados.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e pelo financiamento deste trabalho.

Ao meu pai Rolf (em memória) e à minha mãe Crista, pela atenção, pelos cuidados, pelos exemplos e pelo apoio à minha carreira profissional.

Aos meus irmãos Márcio e Ricardo, pela amizade, pelos auxílios e pelo incentivo à minha carreira profissional.

Ao Rodrigo e Marcelo Luiz, pela amizade sincera, pelo companheirismo e pelo apoio contínuo desde que nos conhecemos.

À Ana Cláudia, Ana Angélica, Áurea, Evelise, Juliet, Kátia Naomi, Luciane, Nélon, Sheila, Vera Lícia, Vetúria e Yara, pela amizade, pelo incentivo, pela confiança e pelos auxílios, desde o início de minha carreira profissional.

À Margherita, pela amizade, pelo apoio, pelas orientações, pelo incentivo e por ser minha maior referência de conduta profissional.

À Thereza Christine e ao José Márcio, pela confiança, pelo incentivo, pela atenção e pelo carinho, desde minha chegada em Fortaleza.

Ao Gledson, Renato e Rita, pelos momentos de descontração e pelo apoio nos momentos difíceis durante minha estada em Fortaleza.

Ao João Paulo, Josemir, Luiz e Sérgio, pelas discussões científicas, pelos auxílios e pela vivência amistosa.

À Cristina, Evandro, Marcelo, Rafael, Raquel e Thatiana, por todos os auxílios e pela vivência amistosa.

À Rafaela, por todos os auxílios, conversas e aprendizados durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Maria Edinilda (Nega), por todo carinho, atenção, incentivo e confiança, além dos saborosos cafés durante minha permanência no LABPLANT.

Ao Adilton, pelo carinho, pela atenção, pela confiança, pela admiração, pelas brincadeiras e pela fé em minha pessoa.

Ao Atair, pela paciência, pela atenção e por todo o acompanhamento prestado durante esta parte da minha existência.

Em especial, agradeço ao Pai pelo apoio incondicional durante minha caminhada e pela oportunidade de exercer meus dons em minha vivência profissional.

## RESUMO

A salinidade elevada do solo pode estar associada à escassez de  $K^+$ , propiciando estresses interativos sobre a nutrição das plantas, os quais prejudicam a produção agrícola. Os mecanismos de transporte de  $Na^+$  e  $K^+$  nas interfaces solo-simplasto radicular-xilema são decisivos para o estabelecimento da toxicidade de  $Na^+$  nas plantas submetidas ao estresse salino, especialmente sob baixa disponibilidade de  $K^+$ . Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi caracterizar fisiologicamente os mecanismos de transporte de  $Na^+$  e  $K^+$  envolvidos com a absorção e o carregamento do xilema nas raízes de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. A absorção de  $Na^+$  por mecanismos de baixa afinidade, investigada por experimentos de influxo em raízes destacadas, foi mediada por uma via sensível e uma via insensível ao  $Ca^{2+}$ . A via sensível ao  $Ca^{2+}$  deve envolver os canais de cátions não-seletivos (NSCCs), enquanto a via insensível deve depender dos canais de  $K^+$  e dos transportadores de  $K^+$  sensíveis ao  $NH_4^+$ . A absorção de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade, examinada pela técnica de influxo em raízes destacadas, envolveu uma via sensível e uma via insensível ao  $NH_4^+$ . A via sensível ao  $NH_4^+$  deve ser mediada pelos transportadores das famílias KT/HAK/KUP e HKT e a via insensível, pelos canais de  $K^+$ . O carregamento de  $Na^+$  e  $K^+$  no xilema, estudado por experimentos de exudação radicular, indicou que a elevada seletividade  $K^+/Na^+$  apresentada por feijão caupi foi colapsada sob concentrações externas de  $Na^+$  superiores a 20 mM, na presença de  $K^+$  1 mM. O acesso quase irrestrito de  $Na^+$  ao xilema radicular foi compensado pela liberação aumentada de  $K^+$  na seiva e pela manutenção do fluxo de  $K^+$  para a parte aérea. A compartimentalização de  $Na^+$  nas raízes deve atuar como barreira fisiológica para excluir  $Na^+$  das folhas e, conseqüentemente, deve evitar a toxicidade desse íon em feijão caupi pela manutenção da alta relação  $K^+/Na^+$  foliar. A privação de  $K^+$  aliada ao tratamento salino intensificou o fluxo de  $Na^+$  e restringiu o fluxo de  $K^+$  no xilema radicular, além de aumentar a acumulação de  $Na^+$  nas folhas novas, propiciando condições menos favoráveis à homeostase iônica em feijão caupi, em comparação com o estresse salino aplicado isoladamente.

Palavras-chave: Absorção de  $Na^+$  e  $K^+$ . Carregamento de  $Na^+$  e  $K^+$  no xilema. Partição de  $Na^+$  e  $K^+$ . *Vigna unguiculata*.

## ABSTRACT

High soil salinity can be associated with  $K^+$  starvation enabling interactive stresses on plant nutrition that impair crop production. The transport mechanisms on the soil-root symplast-xylem boundaries are crucial to the establishment of  $Na^+$  toxicity under salt stress, especially under low  $K^+$  availability. Then, the aim of this work was the physiological characterization of  $Na^+$  and  $K^+$  uptake and xylem loading in the roots of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Low-affinity  $Na^+$  uptake, investigated by influx experiments using detached roots, was mediated by  $Ca^{2+}$ -sensitive and  $Ca^{2+}$ -insensitive pathways. The  $Ca^{2+}$ -sensitive pathway may involve non-selective cation channels (NSCCs), while the  $Ca^{2+}$ -insensitive pathway may depend on  $K^+$  channels and  $NH_4^+$ -sensitive  $K^+$  transporters. High-affinity  $K^+$  uptake, examined by the excised root technique, involved  $NH_4^+$ -sensitive and  $NH_4^+$ -insensitive pathways. The  $NH_4^+$ -sensitive pathway may be mediated by  $K^+$  transporters from the KT/HAK/KUP e HKT families and the  $NH_4^+$ -insensitive pathway may depend on  $K^+$  channels. Xylem loading, assessed by root exudation experiments, indicates that the high  $K^+/Na^+$  selectivity showed by cowpea was collapsed under external  $Na^+$  concentrations above 20 mM in the presence of 1 mM  $K^+$ . The  $Na^+$  access to the root xylem was almost unrestricted and it was compensated by enhanced  $K^+$  release to the sap. The  $Na^+$  compartmentation into the root cells may act as a physiological barrier to  $Na^+$  exclusion from the leaves, avoiding  $Na^+$  toxicity in cowpea due to the maintenance of the high leaf  $K^+/Na^+$  ratio.  $K^+$  starvation associated with salt stress intensified the  $Na^+$  flux and restricted the  $K^+$  flux into the root xylem, as it enhanced  $Na^+$  accumulation in the young leaves, allowing unfavourable conditions to ionic homeostasis in cowpea in comparison with salt stress applied individually.

Keywords:  $Na^+$  and  $K^+$  uptake.  $Na^+$  and  $K^+$  xylem loading.  $Na^+$  and  $K^+$  partitioning. *Vigna unguiculata*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Modelo proposto para os mecanismos de transporte de $\text{Na}^+$ e $\text{K}^+$ nas interfaces solo-simplasto radicular-xilema em plantas sob privação de $\text{K}^+$ e estresse salino .....	32
Figura 2.1 – Efeito do tempo de exposição ao $\text{Na}^+$ externo sobre a acumulação de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi .....	51
Figura 2.2 – Efeito da concentração externa de $\text{Na}^+$ sobre o influxo líquido de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi .....	52
Figura 2.3 – Efeito da concentração externa de $\text{Ca}^{2+}$ sobre o influxo líquido de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi .....	53
Figura 2.4 – Efeito da concentração externa de $\text{K}^+$ sobre o influxo líquido de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi .....	54
Figura 2.5 – Efeitos interativos da concentração externa de $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{K}^+$ sobre o influxo líquido de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi .....	55
Figura 2.6 – Efeito de inibidores de canais de cátions sobre o influxo líquido de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi .....	56
Figura 2.7 – Efeito de bloqueadores de canais de $\text{K}^+$ sobre o influxo líquido de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi .....	57
Figura 2.8 – Efeitos interativos de inibidores de canais de cátions e bloqueadores de canais de $\text{K}^+$ sobre o influxo líquido de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi .....	58
Figura 2.9 – Efeito da concentração externa de $\text{NH}_4^+$ sobre o influxo líquido de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi crescidas na ausência ou na presença de $\text{NH}_4^+$ .....	59
Figura 2.10 – Modelo proposto para as vias de absorção de $\text{Na}^+$ de baixa afinidade em raízes de feijão caupi .....	64
Figura 3.1 – Efeito do tempo de exposição ao $\text{Na}^+$ externo sobre a concentração de $\text{Na}^+$ (A) e $\text{K}^+$ (B) e a relação $\text{K}^+/\text{Na}^+$ (C) na seiva de xilema em feijão caupi .....	78
Figura 3.2 – Efeito do tempo de exposição ao $\text{Na}^+$ externo sobre o fluxo de seiva (A) e o fluxo de $\text{Na}^+$ (B) e $\text{K}^+$ (C) no xilema de feijão caupi .....	79
Figura 3.3 – Efeito da concentração externa de $\text{Na}^+$ sobre a concentração de $\text{Na}^+$ (A) e $\text{K}^+$ (B) e a relação $\text{K}^+/\text{Na}^+$ (C) na seiva de xilema em feijão caupi .....	82

Figura 3.4 – Efeito da concentração externa de $\text{Na}^+$ sobre o fluxo de seiva (A) e o fluxo de $\text{Na}^+$ (B) e $\text{K}^+$ (C) no xilema de feijão caupi .....	83
Figura 3.5 – Efeito da concentração externa de $\text{K}^+$ e $\text{Na}^+$ sobre a concentração de $\text{Na}^+$ (A) e $\text{K}^+$ (B) e a relação $\text{K}^+/\text{Na}^+$ (C) na seiva de xilema em feijão caupi .....	85
Figura 3.6 – Efeito da concentração externa de $\text{K}^+$ e $\text{Na}^+$ sobre o fluxo de seiva (A) e o fluxo de $\text{Na}^+$ (B) e $\text{K}^+$ (C) no xilema de feijão caupi .....	87
Figura 4.1 – Efeito do tempo de exposição ao $\text{K}^+$ externo sobre a depleção de $\text{K}^+$ (A) e a quantidade de $\text{K}^+$ absorvida por unidade de massa (B) pelas raízes de feijão caupi privadas desse cátion .....	111
Figura 4.2 – Efeito da concentração externa de $\text{K}^+$ sobre o influxo líquido de $\text{K}^+$ em raízes de feijão caupi privadas deste cátion .....	112
Figura 4.3 – Efeito da concentração externa do $\text{NH}_4^+$ sobre o influxo líquido de $\text{K}^+$ nas raízes de feijão caupi privadas do $\text{K}^+$ e crescidas na ausência ou na presença do $\text{NH}_4^+$ .....	113
Figura 4.4 – Efeito de bloqueadores de canais de $\text{K}^+$ sobre o influxo líquido de $\text{K}^+$ nas raízes de feijão caupi privadas deste cátion .....	114
Figura 4.5 – Efeito da concentração externa de $\text{Na}^+$ sobre o influxo líquido de $\text{K}^+$ nas raízes de feijão caupi privadas de $\text{K}^+$ .....	115
Figura 4.6 – Efeito interativo de $\text{Na}^+$ com $\text{NH}_4^+$ , $\text{Cs}^+$ e $\text{Ba}^{2+}$ sobre o influxo líquido de $\text{K}^+$ nas raízes de feijão caupi privadas de $\text{K}^+$ .....	116
Figura 4.7 – Efeito da privação de $\text{K}^+$ seguida da exposição ao $\text{Na}^+$ sobre a concentração de $\text{Na}^+$ (A) e $\text{K}^+$ (B) e a relação $\text{K}^+/\text{Na}^+$ (C) na seiva de xilema de feijão caupi .....	118
Figura 4.8 – Efeito da privação de $\text{K}^+$ seguida da exposição ao $\text{Na}^+$ sobre o fluxo de seiva (A) e o fluxo de $\text{Na}^+$ (B) e $\text{K}^+$ (C) no xilema em plantas de feijão caupi .....	119
Figura 4.9 – Modelo proposto para as vias de absorção de $\text{K}^+$ por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi .....	128

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Efeito do tempo de exposição ao Na <sup>+</sup> externo sobre o conteúdo de Na <sup>+</sup> (μmol g <sup>-1</sup> MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	80
Tabela 3.2 – Efeito do tempo de exposição ao Na <sup>+</sup> externo sobre o conteúdo de K <sup>+</sup> (μmol g <sup>-1</sup> MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	80
Tabela 3.3 – Efeito do tempo de exposição ao Na <sup>+</sup> externo sobre a relação K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	81
Tabela 3.4 – Efeito da concentração externa de Na <sup>+</sup> sobre o conteúdo de Na <sup>+</sup> (μmol g <sup>-1</sup> MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	83
Tabela 3.5 – Efeito da concentração externa de Na <sup>+</sup> sobre o conteúdo de K <sup>+</sup> (μmol g <sup>-1</sup> MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	83
Tabela 3.6 – Efeito da concentração externa de Na <sup>+</sup> sobre a relação K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	84
Tabela 3.7 – Efeito da concentração externa de K <sup>+</sup> e Na <sup>+</sup> sobre o conteúdo de Na <sup>+</sup> (μmol g <sup>-1</sup> MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	88
Tabela 3.8 – Efeito da concentração externa de K <sup>+</sup> e Na <sup>+</sup> sobre o conteúdo de K <sup>+</sup> (μmol g <sup>-1</sup> MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	89
Tabela 3.9 – Efeito da concentração externa de K <sup>+</sup> e Na <sup>+</sup> sobre a relação K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	89
Tabela 4.1 – Efeito da privação de K <sup>+</sup> seguida da exposição ao Na <sup>+</sup> sobre o conteúdo de Na <sup>+</sup> (μmol g <sup>-1</sup> MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	120
Tabela 4.2 – Efeito da privação de K <sup>+</sup> seguida da exposição ao Na <sup>+</sup> sobre o conteúdo de K <sup>+</sup> (μmol g <sup>-1</sup> MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	120
Tabela 4.3 – Efeito da privação de K <sup>+</sup> seguida da exposição ao Na <sup>+</sup> sobre a relação K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi .....	121
Tabela 4.4 – Efeito da privação de K <sup>+</sup> e da exposição ao Na <sup>+</sup> sobre o conteúdo de Na <sup>+</sup> (μmol g <sup>-1</sup> MS) em raízes, caule, folhas velhas e limbos e pecíolos de folhas	

novas de plantas de feijão caupi .....	122
Tabela 4.5 – Efeito da privação de $K^+$ e da exposição ao $Na^+$ sobre o conteúdo de $K^+$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS) em raízes, caule, folhas velhas e limbos e pecíolos de folhas novas de plantas de feijão caupi .....	122
Tabela 4.6 – Efeito da privação de $K^+$ e da exposição ao $Na^+$ sobre a relação $K^+/Na^+$ em raízes, caule, folhas velhas e limbos e pecíolos de folhas novas de plantas de feijão caupi .....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS

AKT/KAT	Transportador de $K^+$ de <i>Arabidopsis</i> , do Inglês <i>Arabidopsis K<sup>+</sup> transporter</i>
CNGCs	Canais de cátions sensíveis a nucleotídeos cíclicos, do Inglês <i>cyclic nucleotide-gated channels</i>
cGMP	Monofosfato 3',5'-cíclico de guanosina, do Inglês <i>guanosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético, do Inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FC	Fusicocina
FCCP	p-trifluormetoxicarbonilcianeto de fenilhidrazona, do Inglês <i>p-trifluoromethoxycarbonylcyanide phenylhydrazone</i>
Flu	Flufenamato
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico, do Inglês <i><math>\gamma</math>aminobutyric acid</i>
GLRs	Receptores de glutamato, do Inglês <i>glutamate receptors</i>
HAK	Transportador de $K^+$ de alta afinidade, do Inglês <i>high-affinity K<sup>+</sup> transporter</i>
HKT	Transportador de $K^+$ de alta afinidade, do Inglês <i>high-affinity K<sup>+</sup> transporter</i>
$J_K$	Fluxo de $K^+$ na seiva de xilema
$J_{Na}$	Fluxo de $Na^+$ na seiva de xilema
$J_V$	Fluxo da seiva de xilema
$[K^+]_{ext}$	Concentração de $K^+$ na solução <b>externa</b>
$K_m$	Constante de Michaelis
$[K^+]_{xil}$	Concentração de $K^+$ na seiva de <b>xilema</b>
KIRCs	Canais retificadores de entrada de $K^+$ , do Inglês <i>K<sup>+</sup> inward-rectifying channels</i>
KORCs	Canais retificadores de saída de $K^+$ , do Inglês <i>K<sup>+</sup> outward-rectifying channels</i>
KT	Transportador de $K^+$ , do Inglês <i>K<sup>+</sup> transporter</i>

KUP	Transportador para captação de $K^+$ , do Inglês <i><b>K</b><sup>+</sup> uptake transporter</i>
LCT	Transportador de cátions de baixa afinidade, do Inglês <i>low-affinity cation transporter</i>
LKT	Transportador de $K^+$ de <i>Lycopersicon</i> , do Inglês <i>Lycopersicon <b>K</b><sup>+</sup> transporter</i>
$[Na^+]_{ext}$	Concentração de <b>Na</b> <sup>+</sup> na solução <b>externa</b>
$[Na^+]_{xil}$	Concentração de <b>Na</b> <sup>+</sup> na seiva de <b>xilema</b>
NHX	Contra-transportador $Na^+/H^+$ , do Inglês <i><b>Na</b><sup>+</sup>/<b>H</b><sup>+</sup> exchangers</i>
NORC	Canal retificador de saída não seletivo, do Inglês <i>nonselective outward-rectifying channel</i>
NSCCs	Canais de cátions não seletivos, do Inglês <i>nonselective cation channels</i>
MES	Ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico
MF	<b>M</b> assa <b>f</b> resca
MS	<b>M</b> assa <b>s</b> eca
SKOR	Retificador de saída de $K^+$ do estelo, do Inglês <i>stelar <b>K</b><sup>+</sup> outward rectifier</i>
SKT	Transportador de $K^+$ de <i>Solanum</i> , do Inglês <i>Solanum <b>K</b><sup>+</sup> transporter</i>
SOS	Altamente sensível a sal, do Inglês <i>salt overly sensitive</i>
TEA <sup>+</sup>	<b>T</b> etraetil <b>a</b> mônio
Tris	<b>T</b> ris-hidroximetil aminoetano
UR	Umidade <b>r</b> elativa do ar
$V_{máx}$	Velocidade <b>m</b> áxima inicial
XPC	Célula parenquimática do xilema, do Inglês <i>xylem parenchyma cell</i>

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Revisão: Relevância dos mecanismos de transporte de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> nas interfaces solo-simplasto radicular-xilema para a homeostase iônica .....	19
1.1 Nutrição de K <sup>+</sup> e toxicidade de Na <sup>+</sup> .....	20
1.2 Mecanismos de transporte de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> na interface solo-simplasto radicular .....	22
1.3 Mecanismos de transporte de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> na interface simplasto radicular-xilema ...	26
1.4 Considerações finais e perspectivas futuras .....	31
1.5 Referências .....	33
CAPÍTULO 2 - Caracterização fisiológica das vias de absorção de Na <sup>+</sup> por mecanismos de baixa afinidade em raízes de feijão caupi .....	44
2.1 INTRODUÇÃO .....	45
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	47
2.2.1 Material vegetal .....	47
2.2.2 Experimentos de influxo de Na <sup>+</sup> .....	48
2.2.3 Determinação de Na <sup>+</sup> .....	49
2.2.4 Delineamento experimental e análise estatística .....	50
2.3 RESULTADOS .....	50
2.3.1 Caracterização cinética da absorção de Na <sup>+</sup> por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi .....	50
2.3.2 A absorção de Na <sup>+</sup> é parcialmente inibida por Ca <sup>2+</sup> e bloqueada por K <sup>+</sup> .....	52
2.3.3 Inibição farmacológica da absorção de Na <sup>+</sup> por inibidores de canais de cátions..	55
2.3.4 A absorção de Na <sup>+</sup> é parcialmente inibida pelo NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , principalmente em plantas crescidas na ausência do NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	58
2.4 DISCUSSÃO .....	59
2.4.1 A absorção de Na <sup>+</sup> nas raízes de feijão caupi é mediada por uma via sensível e uma via insensível ao Ca <sup>2+</sup> .....	60
2.4.2 A via sensível ao Ca <sup>2+</sup> deve ser mediada pelos NSCCs .....	61
2.4.3 Canais de K <sup>+</sup> e transportadores de K <sup>+</sup> sensíveis ao NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> devem mediar a via insensível ao Ca <sup>2+</sup> .....	62

2.4.4 Conclusão .....	64
2.5 REFERÊNCIAS .....	65

CAPÍTULO 3 – Seletividade $K^+/Na^+$ dos mecanismos de carregamento de $Na^+$ e $K^+$	
na seiva de xilema em feijão caupi .....	71
3.1 INTRODUÇÃO .....	72
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	75
3.2.1 Material vegetal .....	75
3.2.2 Tratamentos e coletas .....	75
3.2.3 Determinação de $Na^+$ e $K^+$ .....	77
3.2.4 Determinação do fluxo de seiva, $Na^+$ e $K^+$ .....	77
3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística .....	77
3.3 RESULTADOS .....	77
3.3.1 Efeito do tempo de exposição ao $Na^+$ .....	77
3.3.2 Efeito da concentração externa de $Na^+$ .....	81
3.3.2 Efeito da concentração externa de $K^+$ .....	84
3.4 DISCUSSÃO .....	90
3.4.1 As plantas de feijão caupi apresentam capacidade limitada para excluir $Na^+$ da seiva de xilema .....	90
3.4.2 O carregamento de $K^+$ no xilema é estimulado pelo $Na^+$ , assim como a liberação de $Na^+$ no xilema é promovida pelo $K^+$ .....	91
3.4.3 Os mecanismos de carregamento do xilema em feijão caupi apresentam elevada seletividade $K^+/Na^+$ .....	92
3.4.4 Mecanismos de transporte potencialmente envolvidos no carregamento de $Na^+$ na seiva de xilema .....	93
3.4.5 A redução do fluxo de seiva é um efeito primário do déficit hídrico induzido pelo tratamento salino .....	94
3.4.6 A manutenção do fluxo de $K^+$ mais elevado que o de $Na^+$ pode contribuir para a resistência ao estresse salino .....	94
3.4.7 A exclusão de $Na^+$ da parte aérea deve depender dos mecanismos para a compartimentalização de $Na^+$ nas raízes .....	95

3.4.8 Conclusão .....	96
3.5 REFERÊNCIAS .....	96
CAPÍTULO 4 – Efeitos combinados do estresse salino e da privação de $K^+$ sobre a absorção, o carregamento do xilema e a distribuição de $K^+$ nas plantas de feijão caupi .....	102
4.1 INTRODUÇÃO .....	103
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	106
4.2.1 Material vegetal .....	106
4.2.2 Experimentos com raízes destacadas .....	106
4.2.3 Experimentos com plantas completas .....	107
4.2.4 Determinação de $Na^+$ e $K^+$ .....	109
4.2.5 Delineamento experimental e análise estatística .....	109
4.3 RESULTADOS .....	110
4.3.1 Caracterização cinética da absorção de $K^+$ por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi .....	110
4.3.2 A absorção de $K^+$ por mecanismos de alta afinidade depende de uma via sensível e uma via insensível ao $NH_4^+$ .....	112
4.3.3 Os canais de $K^+$ contribuem minoritariamente para a absorção de $K^+$ por mecanismo de alta afinidade .....	113
4.3.4 Concentrações micromolares de $Na^+$ promovem a absorção de $K^+$ por mecanismos de alta afinidade .....	114
4.3.5 Efeito interativo de $Na^+$ e inibidores farmacológicos sobre a absorção de $K^+$ por mecanismos de alta afinidade .....	115
4.3.6 A privação de $K^+$ reduz a capacidade apresentada pelas plantas de feijão caupi para aumentar o carregamento de $K^+$ no xilema e reduzir o fluxo de $Na^+$ para a parte aérea sob tratamento salino .....	117
4.3.7 A privação de $K^+$ aumenta proporcionalmente a acumulação de $Na^+$ nas plantas de feijão caupi sob tratamento salino .....	121
4.4 DISCUSSÃO .....	123
4.4.1 Caracterização fisiológica da absorção de $K^+$ por mecanismos de alta afinidade	

nas raízes de feijão caupi .....	123
4.4.2 A via sensível ao $\text{NH}_4^+$ deve depender dos HAKs e HKTs .....	125
4.4.3 Os canais de $\text{K}^+$ devem mediar a via insensível ao $\text{NH}_4^+$ .....	125
4.4.5 A estimulação da absorção de $\text{K}^+$ pelo $\text{Na}^+$ em concentrações micromolares indica a participação dos HKTs .....	126
4.4.6 O $\text{Na}^+$ pode exercer efeito inibitório sobre a via sensível e a via insensível ao $\text{NH}_4^+$ .....	126
4.4.7 Modelo proposto para a absorção de $\text{K}^+$ por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi .....	127
4.4.8 A privação de $\text{K}^+$ seguida pelo estresse salino reduz a capacidade apresentada pelas plantas de feijão caupi para compensar a entrada de $\text{Na}^+$ no xilema pelo carregamento aumentado de $\text{K}^+$ .....	128
4.4.9 A privação de $\text{K}^+$ pode aumentar a exposição das plantas de feijão caupi à toxicidade de $\text{Na}^+$ sob estresse salino .....	130
4.4.10 Conclusão .....	132
4.5 REFERÊNCIAS .....	132

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO

RELEVÂNCIA DOS MECANISMOS DE TRANSPORTE DE  $\text{Na}^+$  E  $\text{K}^+$  NAS  
INTERFACES SOLO-SIMPLASTO RADICULAR-XILEMA PARA A  
HOMEOSTASE IÔNICA

## 1.1 NUTRIÇÃO DE K<sup>+</sup> E TOXICIDADE DE Na<sup>+</sup>

O K<sup>+</sup> é um dos nutrientes minerais requeridos pelas plantas em maiores quantidades e é o cátion mais abundante nas células vegetais (GIERTH; MÄSER, 2007; LEBAUDY *et al.*, 2007; MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Apesar da concentração de K<sup>+</sup> na solução do solo ser geralmente baixa, da ordem de 0,1 a 6,0 mM, o conteúdo de K<sup>+</sup> nos tecidos vegetais é elevado, perfazendo de 2 a 10% da massa seca (ASHLEY *et al.*, 2006). Entretanto, a distribuição desse nutriente nos diferentes órgãos das plantas parece não ser uniforme, uma vez que o conteúdo de K<sup>+</sup> nas raízes e nos caules pode ser inferior ao encontrado nas folhas (ASHRAF; HAMAD, 2000; CABOT *et al.*, 2005; DURAND; LACAN, 1994; MISRA; DWIVEDI, 2004). A concentração de K<sup>+</sup> pode variar nos diversos compartimentos subcelulares, pois no citosol é mantida acima de 100 mM (APSE; BLUMWALD, 2007; MAATHUIS; AMTMANN, 1999) e no vacúolo pode variar de 20 a 200 mM, dependendo do tecido e da disponibilidade desse nutriente (ASHLEY *et al.*, 2006).

As funções biológicas desempenhadas pelo K<sup>+</sup> nas plantas envolvem processos celulares e fisiológicos diversos. Nas células vegetais, o K<sup>+</sup> atua na manutenção do potencial da membrana plasmática, no balanço das cargas negativas do citosol e na manutenção da pressão osmótica do vacúolo (GIERTH; MÄSER, 2007; LEBAUDY *et al.*, 2007; MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Ainda, diversas enzimas da fotossíntese, da respiração e da biossíntese de proteínas dependem do K<sup>+</sup> como cofator (GIERTH; MÄSER, 2007; MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Considerando a planta completa, a acumulação de K<sup>+</sup> nos elementos de vaso do xilema mantém a pressão radicular que movimenta a seiva bruta das raízes para as folhas na ausência da transpiração (LEBAUDY *et al.*, 2007; MENGEL; KIRKBY, 2001). Outros movimentos também dependem do K<sup>+</sup>, como os tropismos e os nastismos, além dos movimentos dos estômatos e pulvinos (LEBAUDY *et al.*, 2007).

As plantas adquirem K<sup>+</sup> a partir da solução do solo, de modo que a disponibilidade desse nutriente depende não apenas do seu conteúdo total no solo, mas também da sua dinâmica. A dinâmica de K<sup>+</sup> pode ser alterada pela concentração de outros íons na solução do solo, prejudicando a sua aquisição pelas plantas (ASHLEY *et al.*, 2006). Assim, a elevada salinidade dos solos consiste em uma das principais condições ambientais adversas que comprometem a nutrição potássica. Os solos salinos têm elevada concentração de sais solúveis, apresentando

condutividade elétrica igual ou superior a 4 dS m<sup>-1</sup> nos extratos de pasta saturada, o que equivale a NaCl 40 mM. Como o NaCl é geralmente o sal mais solúvel e comum nos solos salinos, a salinidade pode ser decorrente da elevada sodicidade. Os solos sódicos apresentam alta porcentagem de Na<sup>+</sup> trocável, igual ou superior a 15% (MUNNS, 2005). De acordo com essas características, o Na<sup>+</sup> pode ser o principal íon tóxico para as plantas expostas aos solos salinos. A toxicidade de Na<sup>+</sup> sobre a nutrição de K<sup>+</sup> pode ser agravada pela escassez desse nutriente, condição comum sob estresse salino (RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2000).

Em plantas que habitam solos com baixa salinidade, as células normalmente mantêm elevadas concentrações de K<sup>+</sup> (100-200 mM) e baixas concentrações de Na<sup>+</sup> (1-10 mM) no citosol. Essa elevada relação K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> é considerada fundamental para a homeostase iônica das células vegetais, pois é favorável à atividade das enzimas citosólicas dependentes do K<sup>+</sup> (APSE; BLUMWALD, 2007; MAATHUIS; AMTMANN, 1999; ZHU, 2003). Portanto, em plantas que crescem em solos salinos, as células podem apresentar distúrbios na homeostase iônica devido ao aumento da concentração de Na<sup>+</sup> e/ou a diminuição da concentração de K<sup>+</sup> no citosol, causando a conseqüente redução da relação K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (SERRANO; RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2001; ZHU, 2003).

Devido às similaridades físico-químicas entre Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, a alta concentração de Na<sup>+</sup> aliada à baixa concentração de K<sup>+</sup> na solução dos solos salinos pode acarretar a competição entre esses cátions por sítios de transporte na interface solo-simplasto radicular. Assim, a absorção de K<sup>+</sup> pode ser reduzida, causando a deficiência desse nutriente (MAATHUIS; AMTMANN, 1999; ZHU, 2003). Além disso, a acumulação de Na<sup>+</sup> no citosol pode causar distúrbios metabólicos devido à competição entre K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> pelos sítios de ligação nas enzimas dependentes do K<sup>+</sup> (MAATHUIS; AMTMANN, 1999; TESTER; DAVENPORT, 2003). Essas evidências indicam que a elevada salinidade e a escassez de K<sup>+</sup> podem apresentar efeitos interativos sobre a nutrição potássica, exacerbando a toxicidade de Na<sup>+</sup> sobre a absorção, a distribuição e a utilização do K<sup>+</sup> pelas plantas (APSE; BLUMWALD, 2007; MAATHUIS; AMTMANN, 1999).

Nesse contexto, os mecanismos de transporte de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> exercem papel central na homeostase iônica, sobretudo em plantas privadas de K<sup>+</sup> e expostas a solos salinos. As interações entre esses cátions em mecanismos de transporte são complexas, pois envolvem processos que operam nas células, nos tecidos ou órgãos e até mesmo na planta completa (TESTER; DAVENPORT, 2003). Nas células vegetais, a intercomunicação entre o apoplasto, o citosol e o

vacúolo envolve o transporte de íons através da membrana plasmática e do tonoplasto (SERRANO; RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2001; ZHU, 2003). Além disso, o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  na planta completa compreende os processos de absorção pelas raízes, distribuição pelo xilema, recirculação pelo floema e efluxo para o solo (MAATHUIS; AMTMANN, 1999; TESTER; DAVENPORT, 2003).

Os mecanismos de absorção na interface solo-simplasto radicular, envolvendo as células epidérmicas e corticais, determinam quais íons entram no simplasto e em qual proporção. Em seguida, os mecanismos de carregamento na interface simplasto radicular-xilema, desempenhados pelas células parenquimáticas adjacentes aos elementos de vaso, determinam o envio dos íons absorvidos para a parte aérea (MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Dessa forma, a interferência de  $\text{Na}^+$  sobre a absorção e o carregamento de  $\text{K}^+$  no xilema é um fator primário para o estabelecimento de distúrbios na homeostase iônica de plantas crescidas sob salinidade elevada. A elucidação dos mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  nas interfaces solo-simplasto radicular-xilema é fundamental para a identificação dos processos utilizados pelas plantas para superar os estresses nutricionais causados pelo excesso de  $\text{Na}^+$  associado à escassez de  $\text{K}^+$ .

## 1.2 MECANISMOS DE TRANSPORTE DE $\text{Na}^+$ E $\text{K}^+$ NA INTERFACE SOLO-SIMPLASTO RADICULAR

As primeiras iniciativas voltadas para a elucidação dos mecanismos de absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  pelas raízes das plantas são baseadas em experimentos de influxo utilizando-se isótopos radioativos. A caracterização cinética do influxo de  $^{42}\text{K}^+$ ,  $^{86}\text{Rb}^+$  (EPSTEIN *et al.*, 1963) e de  $^{22}\text{Na}^+$  (RAINS; EPSTEIN, 1967a; RAINS; EPSTEIN, 1967b) em raízes destacadas de cevada demonstra que a absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  é mediada por dois componentes saturáveis. O primeiro componente opera em concentrações micromolares desses íons, representando o mecanismo de transporte 1 de cátions alcalinos ou de alta afinidade, enquanto que o segundo componente atua em concentrações milimolares, consistindo no mecanismo de transporte 2 ou de baixa afinidade. O transporte de  $\text{Na}^+$  pelo mecanismo 1 é abolido por  $\text{K}^+$  (RAINS; EPSTEIN, 1967a), mas o transporte de  $\text{K}^+$  pelo mesmo mecanismo é apenas parcialmente inibido por  $\text{Na}^+$  (EPSTEIN *et al.*, 1963). Devido à elevada seletividade  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , o mecanismo de transporte 1 é caracterizado como

via de alta afinidade para a absorção de  $K^+$  (EPSTEIN *et al.*, 1963; RAINS; EPSTEIN, 1967a). Em comparação, o transporte de  $Na^+$  pelo mecanismo 2 é parcialmente inibido por  $K^+$ , indicando que esse mecanismo consiste na principal via para a absorção de  $Na^+$  (RAINS; EPSTEIN, 1967a; RAINS; EPSTEIN, 1967b).

Em segmentos radiculares de milho, o influxo de  $^{86}Rb^+$  indica a participação de um componente saturável e um componente linear na absorção de  $K^+$ . O componente saturável pode ser mediado por carreadores, agindo no transporte de alta afinidade, ao passo que o componente linear deve envolver a atividade de canais, atuando no transporte de baixa afinidade (KOCHIAN; LUCAS, 1982). De acordo com o efeito inibitório do  $NH_4^+$  sobre o influxo de  $^{86}Rb^+$ , o componente saturável pode ser identificado como via sensível ao  $NH_4^+$  e o componente linear, como via insensível a esse cátion (VALE *et al.*, 1987). Em experimentos de eletrofisiologia com protoplastos isolados de raízes de *Arabidopsis thaliana*, correntes dependentes de  $K^+$  em concentrações micromolares envolvem mecanismos de co-transporte  $H^+/K^+$  (MAATHUIS; SANDERS, 1994). Complementarmente, correntes similares são inibidas com o aumento do pH e na presença de  $NH_4^+$  em células apicais das raízes dessa espécie (SPALDING *et al.*, 1999), mostrando que o transporte de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade sensíveis ao  $NH_4^+$  é mediado por co-transportadores  $H^+/K^+$ .

O influxo de  $^{22}Na^+$  em raízes de milho apresenta um componente saturável sensível ao  $K^+$ , estimulado sob hiperpolarização induzida por FC (ativador de  $H^+$ -ATPases) e inibido sob despolarização causada por FCCP (desacoplador), indicando a contribuição de carreadores envolvidos no transporte ativo de  $K^+$ . Outro componente, não-saturável e insensível ao  $K^+$ , à FC e ao FCCP pode ser mediado por canais insensíveis à voltagem (JACOBY; HANSON, 1985). Em raízes de algodão, o influxo líquido de  $Na^+$  apresenta um componente saturável sensível ao  $Ca^{2+}$  que opera em concentrações baixas de  $Na^+$  e um componente linear insensível ao  $Ca^{2+}$  que atua em concentrações elevadas de  $Na^+$  (CRAMER *et al.*, 1987).

Transportadores de membrana envolvidos nos mecanismos de transporte de  $Na^+$  e  $K^+$  em plantas estão sendo identificados por técnicas de eletrofisiologia e biologia molecular. Diversas evidências experimentais indicam interações complexas entre  $Na^+$  e  $K^+$  nos mecanismos de transporte mediados por canais de cátions não seletivos (NSCCs) (BUSCHMANN *et al.*, 2000; RUBIO *et al.*, 2003), transportadores de cátions que apresentam baixa afinidade (LCT) (SCHACHTMAN *et al.*, 1997) e transportadores de  $K^+$  das famílias AKT/KAT (GOLLDACK *et*

*al.*, 2003; SPALDING *et al.*, 1999), KT/HAK/KUP (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007; SANTA-MARÍA *et al.*, 1997) e HKT (FAIRBAIRN *et al.*, 2000; HORIE *et al.*, 2001; HORIE *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007). Os NSCCs devem ser os principais transportadores implicados na absorção de Na<sup>+</sup> por mecanismos de baixa afinidade em espécies glicófitas (ESSAH *et al.*, 2003; RUBIO *et al.*, 2003), mas os transportadores de K<sup>+</sup> que apresentam alta afinidade também podem estar envolvidos (HORIE *et al.*, 2007; LAURIE *et al.*, 2002; RUS *et al.*, 2001; SANTA-MARÍA *et al.*, 1997).

Os NSCCs identificados por experimentos de eletrofisiologia em protoplastos isolados de raízes de milho (ROBERTS; TESTER, 1997a), trigo (DAVENPORT; TESTER, 2000; BUSCHMANN *et al.*, 2000) e *A. thaliana* (DEMIDCHIK; TESTER, 2002) medeiam correntes dependentes de Na<sup>+</sup>, as quais são insensíveis à voltagem e parcialmente inibidas pelo Ca<sup>2+</sup>. De acordo com essas propriedades, a absorção de Na<sup>+</sup> por mecanismos de baixa afinidade envolvendo a via sensível ao Ca<sup>2+</sup> deve ser mediada por NSCCs. Embora a identidade molecular desses canais ainda não esteja elucidada, canais de cátions sensíveis a nucleotídeos cíclicos (CNGCs) e receptores de glutamato (GLRs) são candidatos a NSCCs (TESTER; DAVENPORT, 2003). A participação dos CNGCs e GLRs no transporte de Na<sup>+</sup> é salientada em experimentos com protoplastos obtidos a partir de raízes de *A. thaliana*, nos quais correntes dependentes de Na<sup>+</sup> são inibidas por nucleotídeos cíclicos (MAATHUIS; SANDERS, 2001) e estimuladas por glutamato (DEMIDCHIK *et al.*, 2004). A via de absorção de Na<sup>+</sup> sensível ao Ca<sup>2+</sup> também pode ser mediada pelo LCT1, identificado em raízes de trigo (SCHACHTMAN *et al.*, 1997). A expressão heteróloga desse transportador em leveduras propicia o transporte de Na<sup>+</sup> sob concentrações milimolares, o qual é inibido parcialmente pelo Ca<sup>2+</sup>. Entretanto, parece que o LCT1 é um transportador típico de trigo, já que transportadores similares não têm sido identificados em outras espécies.

Transportadores da família AKT/KAT são canais de K<sup>+</sup> do tipo “Shaker” que medeiam condutâncias retificadoras de entrada de K<sup>+</sup> (KIRCs) sob hiperpolarização de membrana ou condutâncias retificadoras de saída de K<sup>+</sup> (KORCs) sob despolarização (LEBAUDY *et al.*, 2007). Os KIRCs expressos em raízes, como AKT1 de *A. thaliana* (HIRSH *et al.*, 1998), SKT1 de batata (ZIMMERMANN *et al.*, 1998) e LKT1 de tomate (HARTJE *et al.*, 2000) estão implicados no transporte de K<sup>+</sup> por mecanismos de baixa afinidade. No entanto, experimentos utilizando o mutante com perda de função *akt1* de *A. thaliana*, indicam que o AKT1 também está envolvido

no transporte de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade insensíveis ao  $NH_4^+$  (HEIRSH *et al.*, 1998; SPALDING *et al.*, 1999). Embora esses canais apresentem alta seletividade  $K^+/Na^+$ , presume-se que os KIRCs podem mediar o transporte de  $Na^+$  por mecanismos baixa afinidade em condições de salinidade elevada (AMTMANN; SANDERS, 1999). De fato, a expressão de AKT1 em raízes de arroz é diminuída nas variedades resistentes cultivadas sob estresse salino (GOLLDACK *et al.*, 2003).

A família KT/HAK/KUP inclui transportadores de  $K^+$  que devem catalisar o co-transporte  $H^+/K^+$  (RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2000). A expressão de HAK1 de cevada (SANTA-MARÍA *et al.*, 2000), arroz (BAÑUELOS *et al.*, 2002) e pimenta (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005) e HAK5 de tomate (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007) em raízes sob privação de  $K^+$  coincide com a presença de uma via sensível ao  $NH_4^+$  que medeia a absorção de  $K^+$  em concentrações micromolares. Além disso, a expressão heteróloga de HAK1 de cevada (SANTA-MARÍA *et al.*, 1997; SANTA-MARÍA *et al.*, 2000) e arroz (BAÑUELOS *et al.*, 2002) e HAK5 de *A. thaliana* (RUBIO *et al.*, 2000) em leveduras mutantes deficientes em transportadores de  $K^+$ , confirmam que os HAKs estão envolvidos no transporte de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade sensíveis ao  $NH_4^+$ . Apesar disso, o HAK1 de cevada também pode mediar o transporte de  $Na^+$  por mecanismos de baixa afinidade (SANTA-MARÍA *et al.*, 1997).

Os transportadores pertencentes à família HKT, inicialmente caracterizados como transportadores de  $K^+$  que apresentam alta afinidade (SCHACHTMAN; SCHROEDER, 1994), também podem ser induzidos em raízes sob privação de  $K^+$  (HORIE *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 1998). Experimentos de expressão heteróloga em ovócitos de *Xenopus leavis* e leveduras demonstram que HKT1 de trigo (GRASSMAN *et al.*, 1996), HKT1 e HKT2 de *Eucalyptus camaldulensis* (FAIRBAIRN *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2001) e HKT2 de arroz (HORIE *et al.*, 2001) atuam como co-transportadores  $Na^+/K^+$ , enquanto HKT1 de *A. thaliana* (UOZOMI *et al.*, 2000) e arroz (HORIE *et al.*, 2001) agem como transportadores de  $Na^+$  que apresentam baixa afinidade. Além disso, mutantes com perda de função *hkt1* de *A. thaliana* (RUS *et al.*, 2001), trigo (LAURIE *et al.*, 2002) e arroz (HORIE *et al.*, 2007) apresentam sensibilidade diminuída à salinidade, indicando indiretamente o papel desse transportador na absorção de  $Na^+$ . Corroborando com essas evidências, correntes dependentes de  $K^+$  em concentrações micromolares são estimuladas por  $Na^+$  nas raízes do mutante *akt1* de *A. thaliana* (SPALDING *et al.*, 1999).

As vias para a absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade podem apresentar variações entre espécies glicófitas. Em raízes de milho, a caracterização cinética do influxo de  $^{22}\text{Na}^+$  demonstra a participação de canais de cátions insensíveis à voltagem e transportadores de  $\text{K}^+$  dependentes de energia metabólica na absorção de  $\text{Na}^+$  (JACOBY; HANSON, 1985). A acumulação de  $\text{Na}^+$  nas raízes de pimenta depende de uma via principal sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  e uma via secundária insensível a esse cátion (RUBIO *et al.*, 2003). Como a acumulação de  $\text{Na}^+$  é parcialmente inibida por  $\text{K}^+$  e 8-bromo-cGMP (análogo de cGMP permeável a membranas), sugere-se que a via sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  seja mediada por NSCCs e a via insensível, por transportadores de  $\text{K}^+$  das famílias KT/HAK/KUP e HKT. Em raízes de *A. thaliana*, o influxo instantâneo ou unidirecional de  $^{22}\text{Na}^+$  também envolve uma via sensível e a uma via insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  (ESSAH *et al.*, 2003). Aparentemente, essas vias são mediadas por NSCCs, pois o influxo de  $\text{Na}^+$  é estimulado por GABA e glutamato, é reduzido por cGMP e inibidores inespecíficos de canais de cátions, mas não é alterado por bloqueadores de canais de  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Nessa espécie, a participação de AKT1 e HKT1 na via insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  é descartada porque os mutantes com perda de função *akt1* e *hkt1* apresentam influxo de  $\text{Na}^+$  similar ao de plantas selvagens. Como os NSCCs não são completamente bloqueados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (DAVENPORT; TESTER, 2000), a absorção de  $\text{Na}^+$  pela via sensível e insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  nas raízes de *A. thaliana* deve envolver diferentes tipos de NSCCs (ESSAH *et al.*, 2003).

Em contraponto, a absorção de  $\text{Na}^+$  em raízes da halófito *Suaeda maritima* não depende dos NSCCs, pois o influxo instantâneo de  $^{22}\text{Na}^+$  e a acumulação de  $\text{Na}^+$  nos tecidos não são inibidos pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e pelo cAMP (WANG *et al.*, 2007). As raízes dessa espécie apresentam duas vias para absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade. A via 1 atua sob salinidade baixa (NaCl 25 mM) e deve depender dos transportadores de  $\text{K}^+$  da família HKT, por ser sensível a  $\text{Ba}^{2+}$  e insensível a tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ ) e  $\text{Cs}^+$ . A via 2 é ativa sob salinidade elevada (NaCl 150 mM) e deve ser mediada por canais de  $\text{K}^+$  da família AKT/KAT, pois é sensível a  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{TEA}^+$  e  $\text{Cs}^+$ . Estas observações demonstram claramente que as investigações limitadas à planta modelo *A. thaliana* são insuficientes para esclarecer a multiplicidade das vias que possibilitam a absorção de  $\text{Na}^+$  pelas raízes das plantas. A caracterização dessas vias em outras espécies pode contribuir sobremaneira para a compreensão mais ampla dos mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  que ocorrem na interface solo-simplasto radicular.

### 1.3 MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Na<sup>+</sup> E K<sup>+</sup> NA INTERFACE SIMPLASTO RADICULAR-XILEMA

A distribuição não-uniforme de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> em plantas expostas à salinidade elevada é uma das primeiras evidências de que mecanismos seletivos atuam no carregamento desses íons no xilema. Flores, frutos e folhas, especialmente as mais novas, apresentam comumente maior conteúdo de K<sup>+</sup> que as partes basais (BLOM-ZANDSTRA *et al.*, 1998; CABOT *et al.*, 2005; JESCHKE *et al.*, 1986; WOLF *et al.*, 1991). Inversamente, as partes basais ou mais velhas apresentam geralmente maior conteúdo de Na<sup>+</sup> que as partes mais novas. Raízes, caules e pecíolos podem atuar como estruturas acumuladoras de Na<sup>+</sup> em dicotiledôneas sob estresse salino (CABOT *et al.*, 2005; DURAND; LACAN, 1994; JESCHKE *et al.*, 1986; SIBOLE *et al.*, 2003), enquanto entrenós basais, bainhas e folhas mais velhas podem exercer papel semelhante em monocotiledôneas (YEO *et al.*, 1985; WOLF *et al.*, 1991; DAVENPORT *et al.*, 2005). A manutenção do conteúdo de K<sup>+</sup> e a prevenção do acúmulo de Na<sup>+</sup> nas folhas preserva os tecidos fotossintetizantes dos efeitos tóxicos de Na<sup>+</sup>. Essa habilidade tem sido reconhecida como um fator de resistência à salinidade elevada em espécies glicófitas (MUNNS; TESTER, 2008; TESTER; DAVENPORT, 2003).

O estabelecimento da distribuição não-uniforme de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> em plantas sob estresse salino depende de mecanismos eficientes para exclusão seletiva de Na<sup>+</sup> da corrente transpiratória na interface simplasto radicular-xilema. A distribuição de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> em plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) demonstra a formação de um gradiente decrescente das raízes para as folhas. Assim, mecanismos de retenção de Na<sup>+</sup> nas raízes e nas partes basais do caule podem competir com mecanismos de carregamento de Na<sup>+</sup> no xilema, evitando a acumulação desse íon nas folhas (JACOBY, 1964). Em plantas de *Phaseolus coccineus* tratadas com NaCl, a análise de cortes transversais de raízes congeladas por raios-X revela que as células parenquimáticas do xilema (XPCs) acumulam até 40 vezes mais Na<sup>+</sup> que as células corticais e os elementos de vaso. Desse modo, as XPCs diferenciadas em células de transferência parecem desempenhar algum papel na exclusão de Na<sup>+</sup> da corrente transpiratória (KRAMER *et al.*, 1977). A utilização da mesma técnica em raízes de videira mantidas sob estresse salino demonstra que Na<sup>+</sup> é compartimentalizado no vacúolo de células localizadas no córtex interno, na endoderme e no periciclo. Esse processo de compartimentalização pode atuar como uma barreira contra o

carregamento de  $\text{Na}^+$  nos elementos de vaso em plantas de videira (STOREY *et al.*, 2003). Experimentos de recirculação de  $^{22}\text{Na}^+$  em plantas de feijão comum mostram que a exposição de uma parte do sistema radicular a esse isótopo permite a detecção de  $\text{Na}^+$  até a base do caule e no meio externo que banha a outra parte do sistema radicular, não exposta ao isótopo. Esses resultados indicam que essa espécie pode apresentar mecanismos de reabsorção de  $\text{Na}^+$  a partir da seiva de xilema, impedindo a transferência desse íon para as folhas (JACOBY, 1979).

A quantificação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  na seiva de xilema em plantas expostas à salinidade elevada permite comparar a habilidade apresentada por dicotiledôneas e monocotiledôneas para excluir  $\text{Na}^+$  e manter  $\text{K}^+$  na corrente transpiratória. Comparando a concentração de  $\text{Na}^+$  medida na seiva de xilema com aquela aplicada na solução externa, estima-se que as dicotiledôneas conseguem excluir apenas 25 a 60% do  $\text{Na}^+$  externo (DURAND; LACAN, 1994; JESCHKE *et al.*, 1986), enquanto as monocotiledôneas podem excluir mais de 90% (WATSON *et al.*, 2001; WOLF *et al.*, 1991). Desse modo, as monocotiledôneas apresentam maior habilidade para excluir  $\text{Na}^+$  da corrente transpiratória sob salinidade elevada. Apesar disso, as dicotiledôneas (DURAND; LACAN, 1994; JESCHKE *et al.*, 1986) podem apresentar concentração de  $\text{K}^+$  na seiva de xilema até duas vezes maior que aquela encontrada em monocotiledôneas (WATSON *et al.*, 2001; WOLF *et al.*, 1991) quando estas plantas são tratadas com NaCl. Ainda, o tratamento salino aumenta a liberação de  $\text{K}^+$  no xilema em dicotiledôneas (CABOT *et al.*, 2005; DURAND; LACAN, 1994; LACAN; DURAND, 1995;), mas não apresenta efeito semelhante em monocotiledôneas. Esses achados salientam que as dicotiledôneas demonstram maior capacidade de transportar  $\text{K}^+$  para a parte aérea sob estresse salino.

A homeostase iônica das plantas pode depender de interações complexas entre os mecanismos que medeiam o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  na interface simplasto radicular-xilema. Esses mecanismos envolvem não apenas o carregamento de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  nos elementos de vaso após a absorção do meio externo, mas também o recarregamento após a recirculação via floema e a reabsorção da corrente transpiratória ao longo da raiz. Modelos propostos para o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  em plantas de cevada sob estresse salino procuram ressaltar as principais interações entre xilema e floema. As folhas mais velhas são os principais drenos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  transportado pelo xilema, causando a diminuição das concentrações desses íons conforme a seiva ascende. O fornecimento de  $\text{K}^+$  para as folhas mais novas e as raízes depende da recirculação via floema a partir das folhas mais velhas, mas a restrição da recirculação de  $\text{Na}^+$  garante a retenção desse íon

nas partes basais (WOLF *et al.*, 1991; WOLF; JESCHKE, 1987). Dessa maneira, as XPCs devem executar continuamente o carregamento de íons absorvidos do meio externo e daqueles oriundos do floema, contribuindo para a circulação de íons entre raízes e parte aérea.

Mecanismos envolvidos na reabsorção de  $\text{Na}^+$  a partir da corrente transpiratória são indicados pela redução acrópeta da concentração de  $\text{Na}^+$  na seiva de xilema em plantas de soja tratadas com NaCl (DURAND; LACAN, 1994). Experimentos de perfusão em raízes de soja demonstram que as XPCs apresentam mecanismos eficientes para reabsorver  $\text{Na}^+$  e liberar  $\text{K}^+$  na seiva de xilema sob salinidade moderada. A concentração de  $\text{K}^+$  na seiva pode ser dobrada em relação à concentração externa, enquanto que a concentração de  $\text{Na}^+$  pode ser reduzida à metade (LACAN; DURAND, 1995). Estes mecanismos dependem do gradiente de pH entre o simplasto radicular e a seiva do xilema, mantido pela atividade de  $\text{H}^+$ -ATPases, e do potencial de membrana das XPCs, envolvendo o transporte simultâneo de ânions, especialmente  $\text{Cl}^-$ . O modelo proposto para o intercâmbio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  na interface simplasto radicular-xilema em soja envolve a atividade de contra-transportadores  $\text{H}^+/\text{K}^+$  e  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  e de co-transportadores  $\text{H}^+/\text{A}^-$ , onde  $\text{A}^-$  significa ânion monovalente (LACAN; DURAND, 1996).

Experimentos utilizando técnicas de eletrofisiologia e biologia molecular estão esclarecendo a identidade molecular dos transportadores de membrana implicados nos mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  na interface simplasto radicular-xilema. Correntes dependentes de  $\text{K}^+$  são conduzidas por KIRCs e KORCs em protoplastos do estelo radicular de cevada (WEGNER; RASCHKE, 1994) e milho (ROBERTS; TESTER, 1995). Esses canais apresentam elevada seletividade por  $\text{K}^+$  em relação a outros cátions monovalentes, devendo atuar no transporte de  $\text{K}^+$  entre as XPCs e os elementos de vaso (ROBERTS; TESTER, 1997b; WEGNER; DEBOER, 1997). Os KORCs devem mediar o carregamento passivo de  $\text{K}^+$  no xilema, favorecido pelo potencial de membrana estimado para as células parenquimáticas e pelo gradiente de  $\text{K}^+$  existente entre estas células e a seiva (ROBERTS; TESTER, 1995; WEGNER; RASCHKE, 1994). Os KORCs também apresentam elevada permeabilidade para  $\text{Ca}^{2+}$  e a atividade destes canais é aumentada com a diminuição da concentração externa de  $\text{K}^+$  e da concentração interna de  $\text{Ca}^{2+}$ . Desse modo, é possível que os KORCs sejam regulados pela concentração apoplástica de  $\text{K}^+$  e estejam envolvidos em vias de sinalização mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (ROBERTS; TESTER, 1997b; WEGNER; DEBOER, 1997). Presume-se que a concentração apoplástica de  $\text{K}^+$  sinaliza a recirculação desse íon via floema, regulando o

carregamento de  $K^+$  no xilema via KORCs de acordo com a demanda da parte aérea (WEGNER; DEBOER, 1997).

A ativação dos KIRCs pela hiperpolarização da membrana sugere que esses canais podem manter potenciais menos negativos entre as XPCs e a seiva, favorecendo a atividade dos KORCs. Alternativamente, os KIRCs podem estar envolvidos na reabsorção de  $K^+$  a partir da corrente transpiratória (DEBOER; WEGNER, 1997). Além dos KIRCs e KORCs, condutâncias retificadoras de saída não-seletivas (NORCs) ocorrem em protoplastos do estelo radicular de cevada. Estas condutâncias devem ser mediadas por canais ativadas pela despolarização da membrana, com baixa seletividade por cátions monovalentes e sensíveis ao aumento da concentração interna de  $Ca^{2+}$  (DEBOER; WEGNER, 1997; WEGNER; RASCHKE, 1994). É possível que estes canais atuem no carregamento de  $Na^+$  no xilema devido à elevada permeabilidade para esse íon. Ainda, sugere-se que vias de sinalização sistêmica de lesões mediadas por  $Ca^{2+}$  citosólico podem ativar os NORCs, propagando a despolarização da membrana nas XPCs e o aumento da pressão osmótica nos elementos de vaso (DEBOER; WEGNER, 1997).

Um canal do tipo “Shaker”, clonado a partir das raízes de *A. thaliana*, é expresso no periciclo e nas XPCs (GAYMARD *et al.*, 1998). Esse canal retificador de saída de  $K^+$  do estelo (SKOR) apresenta propriedades semelhantes às dos KORCs identificados em cevada (WEGNER; RASCHKE, 1994) e milho (ROBERTS; TESTER, 1995), como elevada seletividade  $K^+/Na^+$ , alta permeabilidade para  $Ca^{2+}$  e sensibilidade à concentração externa de  $K^+$  e à concentração interna de  $Ca^{2+}$ . Além disso, experimentos usando o mutante com perda de função *skor-1* indicam que esse canal medeia o carregamento de  $K^+$  no xilema de *A. thaliana* (GAYMARD *et al.*, 1998). Segundo estas evidências, SKOR pode representar a identidade molecular dos KORCs previamente caracterizados nas XPCs de cevada (WEGNER; RASCHKE, 1994) e milho (ROBERTS; TESTER, 1995). A expressão de SKOR é reduzida por ABA e a atividade desse canal é inibida pela acidificação do citosol. Dessa maneira, a liberação de  $K^+$  no xilema pode ser regulada pela inativação de SKOR devido à diminuição do pH intracelular induzida por ABA em condições de estresse hídrico (LACOMBE *et al.*, 2000).

O transporte de  $Na^+$  na interface simplasto radicular-xilema pode ser mediado por transportadores das famílias NHX e HKT. O transportador SOS1, identificado em um mutante de *A. thaliana* com alta sensibilidade ao estresse salino, é um membro da família NHX induzido por

NaCl (WU *et al.*, 1996; SHI *et al.*, 2000). SOS1 é expresso na membrana plasmática de células localizadas em ápices radiculares e no cilindro vascular de raízes, caule e folhas (SHI *et al.*, 2002). Experimentos baseados na dissipação de gradientes de pH em vesículas de membrana plasmática demonstram que SOS1 atua como contra-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (QIU *et al.*, 2003). Esse transportador pode estar envolvido no efluxo de  $\text{Na}^+$  para o meio externo em ápices radiculares e na exclusão de  $\text{Na}^+$  da corrente transpiratória sob estresse salino (SHI *et al.*, 2002). Em condições de salinidade branda, o mutante com perda de função *sos1* acumula menos  $\text{Na}^+$  na parte aérea que o genótipo selvagem. No entanto, condições de salinidade elevada causam maior acumulação de  $\text{Na}^+$  na parte aérea desse mutante em comparação com os indivíduos selvagens. Assim, é possível que a expressão de SOS1 induzida por sal permita a exclusão de  $\text{Na}^+$  da corrente transpiratória em *A. thaliana* pela reabsorção desse íon a partir da seiva. Contudo, as condições termodinâmicas associadas ao transporte de  $\text{Na}^+$  na interface simplasto radicular-xilema são desfavoráveis para a captação desse íon pelas XPCs (MUNNS; TESTER, 2008).

SOS1 pode estar implicado em uma via de sinalização proposta para o estresse hídrico e salino, denominada via SOS. Nessa via, a elevada osmolaridade associada à escassez de água ou ao excesso de sais no solo é percebida por sensores desconhecidos, que medeiam o aumento da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  (ZHU, 2003). Assim, a proteína ligante ao  $\text{Ca}^{2+}$  semelhante à calcineurina SOS3 (LIU; ZHU, 1998) pode ser ativada, interagindo com a quinase de proteína do tipo serina/treonina SOS2 (LIU *et al.*, 2000). O complexo SOS2/SOS3 pode ativar SOS1 e inibir HKT1 na membrana plasmática, reduzindo a concentração citosólica de  $\text{Na}^+$  (HALFER *et al.*, 2000). Presume-se que um domínio citoplasmático de SOS1 pode atuar como sensor intracelular de  $\text{Na}^+$  (ZHU, 2003). A identificação de transportadores similares a SOS1 em espécies filogeneticamente distantes, como a briófito *P. patens* (BENITO; RODRIGUES-NAVARRO, 2003), a halófito *Cymodocea nodosa* (BENITO *et al.*, 2003) e as glicófitas arroz (QUINTERO *et al.*, 2005) e tomate (BELVER; DONAIRE, 2005), pode indicar que estes mecanismos estão amplamente distribuídos no reino vegetal.

A despeito dos transportadores da família HKT serem associados à entrada de  $\text{Na}^+$  no simplasto radicular (HORIE *et al.*, 2007; LAURIE *et al.*, 2002; RUS *et al.*, 2001), muitas evidências experimentais apontam para a participação desses transportadores na reabsorção de  $\text{Na}^+$  a partir da seiva de xilema. A localização de HKT1 de arroz (GOLLDACK *et al.*, 2002) e *A. thaliana* (MÄSER *et al.*, 2002) é favorável para o seu envolvimento em mecanismos de

transporte na interface simplasto-xilema, pois HKT1 é fortemente expresso no estelo de raízes e nos feixes vasculares de folhas. HKT1 pode promover a retenção de  $\text{Na}^+$  nas células do estelo, pois linhagens transgênicas de trigo com atividade reduzida desse transportador apresentam menor acumulação de  $\text{Na}^+$  no estelo e maior dispersão pelo córtex, em comparação com plantas não transformadas (LAURIE *et al.*, 2002). O tratamento salino acarreta aumento do conteúdo de  $\text{Na}^+$  em raízes e diminuição desse conteúdo em folhas no mutante com perda de função *hkt1* de *A. thaliana*, em relação ao genótipo selvagem (MÄSER *et al.*, 2002). A inativação de HKT1 também causa o aumento da concentração de  $\text{Na}^+$  na seiva de xilema (SUNARPI *et al.*, 2005) e diminui a capacidade apresentada pelas raízes para excluir  $\text{Na}^+$  da parte aérea sob estresse salino (DAVENPORT *et al.*, 2007). Esses resultados indicam fortemente que HKT1 medeia a reabsorção de  $\text{Na}^+$  a partir da seiva de xilema, contribuindo para a menor exposição dos tecidos fotossintetizantes à toxicidade de  $\text{Na}^+$ .

#### 1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Tomando em conjunto as informações disponíveis, é possível propor um modelo integrativo para os mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  nas interfaces solo-simplasto radicular-xilema em plantas sob privação de  $\text{K}^+$  e estresse salino (Fig. 1.1). A escassez de  $\text{K}^+$  pode ser atenuada por mecanismos de transporte de alta afinidade para absorção desse nutriente em concentrações micromolares na periferia das raízes. Estes mecanismos envolvem a participação de transportadores localizados nas células epidérmicas e corticais, como os AKTs, HAKs e HKTs. Os AKTs devem mediar a via insensível ao  $\text{NH}_4^+$ , enquanto os HAKs e HKTs medeiam a via sensível a esse íon, induzida pela privação de  $\text{K}^+$ . Em condições de salinidade elevada, a entrada de  $\text{Na}^+$  no simplasto radicular envolve a participação dos NSCCs e LCTs na via sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  e dos AKTs, HAKs e HKTs na via insensível. Alcançando o simplasto radicular,  $\text{Na}^+$  pode ser transportado até as XPCs via plasmodesmos. O carregamento de  $\text{Na}^+$  na seiva de xilema pode depender dos NORCs, mas a contribuição de SOS1 não pode ser descartada. Os KORCs são as principais vias para liberação de  $\text{K}^+$  nos elementos de vaso, enquanto os KIRCs e HKTs podem contribuir para reabsorção desse íon da seiva de xilema. A exclusão de  $\text{Na}^+$  da corrente transpiratória deve envolver principalmente a atividade dos HKTs. Esse modelo ressalta a

complexidade dos mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  nas interfaces solo-simplasto radicular-xilema. Os transportadores destinados à captação ou carregamento de  $\text{K}^+$  na seiva de xilema, também podem atuar no transporte de  $\text{Na}^+$ , comprometendo a homeostase iônica das plantas. Desse modo, mais investigações são necessárias para esclarecer a contribuição relativa dos diferentes transportadores para manter o aporte de  $\text{K}^+$  e evitar a toxicidade de  $\text{Na}^+$  em plantas expostas simultaneamente à privação de  $\text{K}^+$  e ao estresse salino.

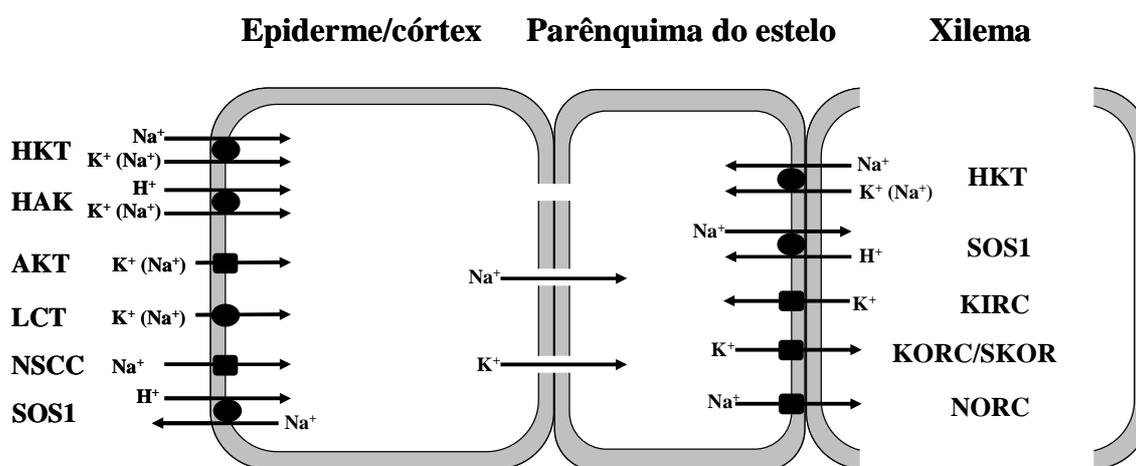


Figura 1.1 – Modelo proposto para os mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  nas interfaces solo-simplasto radicular-xilema em plantas sob privação de  $\text{K}^+$  e estresse salino.

## 1.5 REFERÊNCIAS

AMTMANN, A.; SANDERS, D. Mechanisms of  $\text{Na}^+$  uptake by plant cells. **Advances in Botanical Research**, v. 29, p. 75-112, 1999.

APSE, M.P.; BLUMWALD, E.  $\text{Na}^+$  transport in plants. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2247-2254, 2007.

ASHRAF, M.; AHMAD, S. Influence of sodium chloride on ion accumulation, yield components and fibre characteristics in salt-tolerant and salt-sensitive lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Field Crops Research**, v. 66, p. 115-127, 2000.

ASHLEY, M.K.; GRANT, M.; GRABOV, A. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 425-436, 2006.

BAÑUELOS, M.A.; GARCIADEBLÁS, B.; CUBERO, B.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. **Plant Physiology**, v. 130, p. 784-795, 2002.

BELVER, A; DONAIRE, J. A cDNA for a putative plasmalemma Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from tomato (*Lycopersicon esculentum*) stem. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (acesso em 15/05/2006).

BENITO, B.; RODRÍGUES-NAVARRO, A. Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. **The Plant Journal**, v. 36, p. 382-389, 2003.

BENITO, B.; GARCIADEBLAS, B.; RODRÍGUES-NAVARRO, A. *Cymodocea nodosa* SOS cDNA. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (acesso em 15/05/2006).

BLOM-ZANDSTRA, M.; VOGELZANG, S.A.; VEEN, B.W. Sodium fluxes in sweet pepper exposed to varying sodium concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1863-1868, 1998.

BUSCHMANN, P.H.; VAIDYANATHAN, R.; GASSMANN, W.; SCHROEDER, J.I. Enhancement of Na<sup>+</sup> uptake currents, time-dependent inward-rectifying K<sup>+</sup> channel currents, and K<sup>+</sup> channel transcripts by K<sup>+</sup> starvation in wheat root cells. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1387-1397, 2000.

CABOT, C.; GARCÍA, M.C.; SIBOLE, J.V. Relation between xylem ion concentration and bean growth responses to short-term salinisation in spring and summer. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 327-334, 2005.

CRAMER, G.R.; LYNCH, J.; LÄUCHLI, A.; EPSTEIN, E. Influx of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> into roots of salt-stressed cotton seedlings: effects of supplemental Ca<sup>2+</sup>. **Plant Physiology**, v. 83, p. 510-516, 1987.

DAVENPORT, R.; JAMES, R.A.; ZAKRISSON-PLOGANDER, A.; TESTER, M.; MUNNS, R. Control of sodium transport in durum wheat. **Plant Physiology**, v. 137, p. 807-818, 2005.

DAVENPORT, R.J.; MUÑOZ-MAYOR, A.; JHA, D.; ESSAH, P.A.; RUS, A.; TESTER, M. The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in *Arabidopsis*. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 497-507, 2007.

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

DE BOER, A.H.; WEGNER, L.H. Regulatory mechanisms of ion channels in xylem parenchyma cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 441-449, 1997.

DEMIDCHIK, V.; ESSAH, P.A.; TESTER, M. Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. **Planta**, v. 219, p. 167-175, 2004.

DEMIDCHIK, V.; TESTER, M. Sodium fluxes through non-selective cation channels in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiology**, v. 128, p. 379-387, 2002.

DURAND, M.; LACAN, D. Sodium partitioning within the shoot of soybean. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 65-71, 1994.

EPSTEIN, E.; RAINS, D.W.; ELZAM, O.E. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 49, p. 684-692, 1963.

ESSAH, P.A.; DAVENPORT, R.; TESTER, M. Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 133, p. 307-318, 2003.

FAIRBAIRN, D.J.; LIU, W.; SCHACHTMAN, D.P.; GOMEZ-GALLEG0, S.; DAY, S.R.; TEASDALE, R.D. Characterization of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 515-525, 2000.

GAYMARD, F.; PILOT, G.; LACOMBE, B.; BOUCHEZ, D.; BRUNEAU, D.; BOUCHEREZ, J.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; THIBAUD, J.-B.; SENTENAC, H. Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. **Cell**, v. 94, p. 647-655, 1998.

GIERTH, M.; MÄSER, P. Plant potassium transporters – Involvement in K<sup>+</sup> acquisition, redistribution and homeostasis. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2348-2356, 2007.

GOLLDACK, D.; QUIGLEY, F.; MICHALOWSKI, C.B.; KAMASANI, U.R.; BOHNERT, H.J. Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 71-81, 2003.

GOLLDACK, D.; SU, H.; QUIGLEY, F.; KAMASANI, U.R.; MUÑOZ-GARAY, C.; BALDERAS, E.; POPOVA, O.V.; BENNETT, J.; BOHNERT, H.J.; PANTOJA, O. Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. **The Plant Journal**, v. 31, p. 529-542, 2002.

GRASSMAN, W.; RUBIO, F.; SCHROEDER, J.I. Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. **The Plant Journal**, v. 10, p. 869-952, 1996.

HALFTER, U.; ISHITANI, M.; ZHU, J.-K. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 3735-3740, 2000.

HARTJE, S.; ZIMMERMANN, S.; KLONUS, D.; MÜLLER-RÖBER, B. Functional characterization of LKT1, a K<sup>+</sup> uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel SKT1 after expression in *Xenopus* oocytes. **Planta**, v. 210, p. 723-731, 2000.

HIRSCH, R.E.; LEWIS, B.D.; SPALDING, E.P.; SUSSMAN, M.R. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. **Science**, v. 280, p. 918-912, 1998.

HORIE, T.; COSTA, A.; KIM, T.H.; HAN, M.J.; HORIE, R.; LEUNG, H.-Y.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H.; AN, G.; SCHROEDER, J.I. Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. **EMBO Journal**, v. 26, p. 3003-3014, 2007.

HORIE, T.; YOSHIDA, K.; NAKAYAMA, H.; YAMADA, K.; OIKI, S.; SHINMYO, A. Two types of HKT transporters with different properties of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in *Oryza sativa*. **The Plant Journal**, v. 27, p. 129-138, 2001.

JACOBY, B. Function of bean roots and stems in sodium retention. **Plant Physiology**, v. 39, p. 445-449, 1964.

JACOBY, B. Sodium recirculation and loss from *Phaseolus vulgaris* L. **Annals of Botany**, v. 43, p. 741-744, 1979.

JACOBY, B.; HANSON, J.B. Controls on <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> influx in corn roots. **Plant Physiology**, v. 77, p. 930-934, 1985.

JESCHKE, W.D.; PATE, J.S.; ATKINS, C.A. Effects of NaCl salinity on growth, development, ion transport and ion storage in white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Ultra). **Journal of Plant Physiology**, v. 124, p. 257-274, 1986.

KOCHIAN, L.V.; LUCAS, W.J. Potassium transport in corn roots. 1. Resolution of kinetics into a saturable and a linear component. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1723-1731, 1982.

KRAMER, D.; LÄUCHLI, A.; YEO, A.R. Transfer cells in roots of *Phaseolus coccineus*: ultrastructure and possible function in exclusion of sodium from the shoot. **Annals of Botany**, v. 41, p. 1031-1040, 1977.

LACAN, D.; DURAND, M. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in excised soybean roots. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 132-138, 1995.

LACAN, D.; DURAND, M. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> exchange at the xylem/symplast boundary. **Plant Physiology**, v. 110, p. 705-711, 1996.

LACOMBE, B.; PILOT, G.; GAYMARD, F.; SENTENAC, H.; THIBAUD, J.-B. pH control of the plant outward-rectifying potassium channel SKOR. **FEBS Letters**, v. 466, p. 351-354, 2000.

LAURIE, S.; FEENEY, K.A.; MAATHUIS, F.J.M.; HEARD, P.J.; BROWN, S.J.; LEIGH, R.A. A role of HKT1 in sodium uptake by wheat roots. **The Plant Journal**, v. 32, p. 139-149, 2002.

LEBAUDY, A.; VÉRY, A.-A.; SENTENAC, H. K<sup>+</sup> channel activity in plants: Genes, regulations and functions. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2357-2366, 2007.

LIU, W.; FAIRBAIRN, D.J.; REID, R.J.; SCHACHTMAN, D.P. Characterization of two HKT1 homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capacity. **Plant Physiology**, v. 127, p. 283-294, 2001.

LIU, J.; ZHU, J.-K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. **Science**, v. 280, p. 1943-1945, 1998.

MAATHUIS, F.J.M.; AMTMANN, A. K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. **Annals of Botany**, v. 84, p. 123-133, 1999.

MAATHUIS, F.J.M.; SANDERS, D. Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 9272-9276, 1994.

MAATHUIS, F.J.M.; SANDERS, D. Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1617-1625, 2001.

MÄSER, P.; ECKELMAN, B.; VAIDYANATHAN, R.; HORIE, T.; FAIRBAIRN, D.J.; KUBO, M.; YAMAGAMI, M.; YAMAGUCHI, K.; NISHIMURA, M.; UOZOMI, N.; ROBERTSON, W.; SUSSMAN, M.R.; SCHROEDER, J.I. Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1. **FEBS Letters**, v. 531, p. 157-161, 2002.

MARTÍNEZ-CORDERO, M.A.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. High-affinity K<sup>+</sup> uptake in pepper plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1553-1562, 2005.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of Plant Nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001.

MISRA, N.; DWIVEDI, U.N. Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. **Plant Science**, v. 166, p. 1135-1142, 2004.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **The New Phytologist**, v.167, p. 645-663, 2005.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.

NIEVES-CORDONES, M.; MARTÍNEZ-CORDERO, M.A.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. An NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-sensitive component dominates high-affinity K<sup>+</sup> uptake in tomato plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 273-280, 2007.

QIU, Q.-S.; BARKLA, B.J.; VERA-ESTRELLA, R.; ZHU, J.-K.; SCHUMAKER, K.S. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1041-1052, 2003.

QUINTERO, F.J.; GARCIADÉBLAS, B.; MARTINEZ, J.; PARDO, J.M. Characterization of the rice Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter OsSOS1. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (acesso em 15/05/2006).

RAINS, D.W.; EPSTEIN, E. Sodium absorption by barley roots: role of the dual mechanisms of alkali cation transport. **Plant Physiology**, v. 42, p. 314-318, 1967a.

RAINS, D.W.; EPSTEIN, E. Sodium absorption by barley roots: its mediation by mechanism 2 of alkali cation transport. **Plant Physiology**, v. 42, p. 319-323, 1967b.

ROBERTS, S.K.; TESTER, M. Inward and outward K<sup>+</sup>-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize root cortex and stele. **The Plant Journal**, v. 8, p. 811-825, 1995.

ROBERTS, S.K.; TESTER, M. Patch clamp study of Na<sup>+</sup> transport in maize roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 431-440, 1997a.

ROBERTS, S.K.; TESTER, M. Permeation of Ca<sup>2+</sup> and monovalent cations through an outwardly rectifying channel in maize root stellar cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 839-846, 1997b.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Potassium transport in fungi and plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 1-30, 2000.

RUBIO, F.; FLORES, P.; NAVARRO, J.M.; MARTINEZ, V. Effects of Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and cGMP on Na<sup>+</sup> uptake in pepper plants. **Plant Science**, v. 165, p. 1043-1049, 2003.

RUBIO, F.; SANTA-MARÍA, G.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Cloning of *Arabidopsis* and barley HAK potassium transporters in root and shoot cells. **Physiologia Plantarum**, v. 109, p. 34-43, 2000.

RUS, A.; YOKOL, S.; SHARKHUU, A.; REDDY, M.; LEE, B.; MATSUMOTO, T.K.; KOLWA, H.; ZHU, J.-K.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 14150-14155, 2001.

SANTA-MARÍA, G.E.; DANNA, C.H.; CZIBENER, C. High-affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and -insensitive pathways. **Plant Physiology**, v. 123, p. 297-306, 2000.

SANTA-MARÍA, G.E.; RUBIO, F.; DUBCOVSKY, J.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. **The Plant Cell**, v. 9, p. 2281-2289, 1997.

SCHACHTMAN, D.P.; SCHROEDER, J.I. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. **Nature**, v. 370, p. 655-658, 1994.

SCHACHTMAN, D.P.; KUMAR, R.; SCHROEDER, J.I.; MARSH, E.L. Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 11079-11084, 1997.

SERRANO, R.; RODRIGUEZ-NAVARRO, A. Ion homeostasis during salt stress in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 399-404, 2001.

SHI, H.; ISHITANI, M.; KIM, C.; ZHU, J.-K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 6896-6901, 2000.

SHI, H.; QUINTERO, F.J.; PARDO, J.M.; ZHU, J.-K. The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *SOS1* controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. **The Plant Cell**, v. 14, p. 465-477, 2002.

SIBOLE, J.V.; CABOT, C.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Ion allocation in two different salt-tolerant *Medicago* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1361-1365, 2003.

SPALDING, E.P.; HIRSCH, R.E.; LEWIS, D.R.; QI, Z.; SUSSMAN, M.R.; LEWIS, B.D. Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity. Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. **Journal of General Physiology**, v. 113, p. 909-918, 1999.

STOREY, R.; SCHACHTMAN, D.P.; THOMAS, M.R. Root structure and cellular chloride, sodium and potassium distribution in salinized grapevines. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 789-800, 2003.

SUNARPI; HORIE, T.; MOTODA, J.; KUBO, M.; YANG, H.; YODA, K.; HORIE, R.; CHAN, W.-Y.; LEUNG, H.-Y.; HATTORI, K.; KOMONI, M.; OSUMI, M.; YAMAGAMI, M.; SCHROEDER, J.I.; UOZOMI, N. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. **The Plant Journal**, v. 44, p. 928-938, 2005.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.

UOZOMI, N.; KIM, E.J.; RUBIO, F.; YAMAGUCHI, T.; MUTO, S.; TSUBOI, A.; BAKKER, E.P.; NAKAMURA, T.; SCHROEDER, J.I. The *Arabidopsis* *HKT1* gene homolog mediates inward Na<sup>+</sup> currents in *Xenopus leavis* oocytes and Na<sup>+</sup> uptake in *Sccharomyces cerevisiae*. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1249-1259, 2000.

VALE, F.R.; JACKSON, W.A.; VOLK, R.J. Potassium influx into maize root systems. Influence of root potassium concentration and ambient ammonium. **Plant Physiology**, v. 84, p. 1416-1420, 1987.

WANG, T.-B.; GASSMANN, W.; RUBIO, F.; SCHROEDER, J.I.; GLASS, D.M. Rapid up-regulation of *HKT1*, a high-affinity transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. **Plant Physiology**, v. 118, p. 651-659, 1998.

WANG, S.-M.; ZHANG, J.-L.; FLOWERS, T.J. Low-affinity Na<sup>+</sup> uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. **Plant Physiology**, v. 145, p. 559-571, 2007.

WATSON, R.; PRITCHARD, J.; MALONE, M. Direct measurement of sodium and potassium in the transpiration stream of salt-excluding and non-excluding varieties of wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1873-1881, 2001.

WEGNER, L.H.; RASCHKE, K. Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots: a procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch-clamp exploration of salt passageways into xylem vessels. **Plant Physiology**, v. 105, p. 799-813, 1994.

WEGNER, L.H.; DE BOER, A.H. Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K<sup>+</sup> homeostasis and long-distance signaling. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1707-1719, 1997.

WOLF, O.; JESCHKE, W.D. Modeling of sodium and potassium flows via phloem and xylem in the shoot of salt-stressed barley. **Journal of Plant Physiology**, v. 128, p. 371-386, 1987.

WOLF, O.; MUNNS, R.; TONNET, M.L.; JESCHKE, W.D. The role of the stem in the partitioning of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in salt-treated barley. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 697-704, 1991.

WU, S.-J.; DING, L.; ZHU, J.-K. *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. **The Plant Cell**, v. 8, p. 617-627, 1996.

YEO, A.R.; YEO, E.M.; CAPORN, S.J.M.; LACHNO, D.R.; FLOWERS, T.J. The use of <sup>14</sup>C-ethane diol as a quantitative tracer for the transpirational volume flow of water and an

investigation of the effects of salinity upon transpiration, net sodium accumulation and endogenous ABA in individual leaves of *Oryza sativa* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, p. 1099-1109, 1985.

ZHU, J.-K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 441-445, 2003.

ZIMMERMANN, S.; TALKE<sup>1</sup>, I.; EHRHARDT, T.; NAST, G.; MÜLLER-RÖBER, B. Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. **Plant Physiology**, v. 116, p. 879-890, 1998.

## CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS VIAS PARA A ABSORÇÃO DE Na<sup>+</sup>  
POR MECANISMOS DE BAIXA AFINIDADE EM RAÍZES DE FEIJÃO CAUPI

## 2.1 INTRODUÇÃO

A salinização dos solos cultivados tem aumentado principalmente nas áreas irrigadas, causando a redução da produtividade de várias culturas (MUNNS, 2008). Os prejuízos causados pela salinidade elevada dos solos têm sido atribuídos aos efeitos tóxicos de  $\text{Na}^+$  sobre a nutrição e o metabolismo das plantas, especialmente sobre a absorção, a distribuição e a utilização de  $\text{K}^+$  (APSE; BLUMWALD, 2007). Apesar da absorção de  $\text{Na}^+$  pelas raízes ser um processo crítico para desencadear a acumulação e a toxicidade desse íon nas plantas, as vias para a entrada de  $\text{Na}^+$  no simplasto radicular ainda não são completamente conhecidas. A identificação dos transportadores de membrana que medeiam a absorção de  $\text{Na}^+$  em células vegetais pode viabilizar programas de transformação genética para aumentar a resistência das plantas cultivadas ao estresse salino (MUNNS, 2008).

A absorção de  $\text{Na}^+$  pelas raízes das plantas envolve mecanismos de transporte que apresentam alta e baixa afinidade. Os mecanismos de alta afinidade operam em concentrações micromolares de  $\text{Na}^+$ , enquanto os mecanismos de baixa afinidade atuam em concentrações milimolares desse cátion (RAINS; EPSTEIN, 1967a; RAINS; EPSTEIN, 1967b). Como solos salinizados apresentam concentrações elevadas de  $\text{Na}^+$  trocável (MENGEL; KIRKBY, 2001), os mecanismos de baixa afinidade tem sido mais investigados. A absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade em raízes de espécies glicófitas é geralmente mediada por vias sensíveis e insensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAMER *et al.*, 1987; ESSAH *et al.*, 2003; RUBIO *et al.*, 2003).

Os canais de cátions não-seletivos (NSCCs) (ESSAH *et al.*, 2003; RUBIO *et al.*, 2003; TESTER; DAVENPORT, 2003) e o transportador de cátions que apresenta baixa afinidade (LCT1) (SCHACHTMAN *et al.*, 1997) devem atuar nas vias para a absorção de  $\text{Na}^+$  sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Os NSCCs identificados em raízes medeiam correntes dependentes de  $\text{Na}^+$ , as quais são insensíveis à voltagem e parcialmente inibidas pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (ROBERTS; TESTER, 1997; DAVENPORT; TESTER, 2000; BUSCHMANN *et al.*, 2000; DEMIDCHIK; Tester, 2002). Embora a identidade molecular desses canais ainda não esteja elucidada, os canais de cátions sensíveis a nucleotídeos cíclicos (CNGCs) (MAATHUIS; SANDERS, 2001) e os receptores de glutamato (GLRs) (DEMIDCHIK *et al.*, 2004) são candidatos a NSCCs. O LCT1 de trigo (SCHACHTMAN *et al.*, 1997) também pode contribuir para as vias de absorção de  $\text{Na}^+$  sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , porque é expresso em raízes, apresenta baixa afinidade pelo  $\text{Na}^+$  e é parcialmente inibido

pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . Apesar disso, transportadores similares ao LCT1 não têm sido identificados em outras espécies.

As vias para a absorção de  $\text{Na}^+$  insensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  podem envolver os canais retificadores de entrada de  $\text{K}^+$  (KIRCs) da família AKT/KAT (AMTMANN; SANDERS, 1999) e os transportadores de  $\text{K}^+$  das famílias KT/HAK/KUP (SANTA-MARÍA *et al.*, 1997; RUBIO *et al.*, 2003) e HKT (GRASSMAN *et al.*, 1996; FAIRBAIRN *et al.*, 2000; UOZUMI *et al.*, 2000; HORIE *et al.*, 2001), além dos NSCCs (TESTER; DAVENPORT, 2003). Os KIRCs medeiam a absorção de  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta e baixa afinidade em raízes (HIRSCH *et al.*, 1998; ZIMMERMANN *et al.*, 1998; HARTJE *et al.*, 2000) e podem permitir a entrada de  $\text{Na}^+$  no simplasto radicular sob salinidade elevada (AMTMANN; SANDERS, 1999; GOLLDAK *et al.*, 2003). Os HAKs devem atuar como co-transportadores  $\text{H}^+/\text{K}^+$  com alta afinidade pelo  $\text{K}^+$  (RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2000) e podem ser induzidos em raízes sob a privação desse nutriente (SANTA-MARÍA *et al.*, 2000; RUBIO *et al.*, 2000; BAÑUELOS *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005; NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007). O HAK1 de cevada pode mediar o transporte de  $\text{Na}^+$  em concentrações milimolares desse íon (SANTA-MARÍA *et al.*, 1997). Além disso, os HKTs também podem ser induzidos em raízes crescidas na ausência de  $\text{K}^+$  e podem agir como co-transportadores  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  com alta afinidade (FAIRBAIRN *et al.*, 2000; HORIE *et al.*, 2001) ou transportadores de  $\text{Na}^+$  com baixa afinidade (GRASSMAN *et al.*, 1996; UOZUMI *et al.*, 2000; HORIE *et al.*, 2001). Tendo em vista que as atividades dos KIRCs (ROBERTS; TESTER, 1995) e dos HAKs (SANTA-MARÍA *et al.*, 2000; MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005) e HKTs (TYERMAN; SKERRETT, 1999; LIU *et al.*, 2001) não são inibidas pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , esses transportadores podem apresentar algum papel central nas vias para a absorção de  $\text{Na}^+$  insensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, a participação dos NSCCs nessas vias não pode ser descartada, pois as correntes dependentes de  $\text{Na}^+$  mediadas pelos NSCCs não são completamente bloqueadas pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (DAVENPORT; TESTER, 2000; TESTER; DAVENPORT, 2003).

Em espécies glicófitas, os NSCCs têm sido considerados como os principais transportadores que medeiam a entrada de  $\text{Na}^+$  no simplasto radicular (ESSAH *et al.*, 2003; RUBIO *et al.*, 2003; TESTER; DAVENPORT, 2003). Em raízes de milho, a caracterização cinética do influxo de  $^{22}\text{Na}^+$  demonstra a existência de um componente não-saturável insensível à FC (ativador de  $\text{H}^+$ -ATPases) e ao FCCP (desacoplador), indicando a participação dos canais de

cátions insensíveis à voltagem na absorção de  $\text{Na}^+$  (JACOBY; HANSON, 1985). A acumulação de  $\text{Na}^+$  nas raízes de pimenta depende de uma via principal sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  e 8-bromo-cGMP (análogo de cGMP permeável a membranas), atribuída aos NSCCs, e de uma via secundária insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  e inibida pelo  $\text{K}^+$ , a qual é possivelmente mediada por transportadores de  $\text{K}^+$  (RUBIO *et al.*, 2003). Nas raízes de *Arabidopsis thaliana*, o influxo instantâneo ou unidirecional de  $^{22}\text{Na}^+$  deve ser mediado por diferentes tipos de NSCCs, pois é estimulado por GABA e glutamato, é reduzido pelo cGMP e por inibidores inespecíficos de canais de cátions e não é afetado por bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  (ESSAH *et al.*, 2003). Contrariamente, o influxo instantâneo de  $^{22}\text{Na}^+$  e a acumulação de  $\text{Na}^+$  não marcado nas raízes da halófita *Suaeda maritima* não dependem dos NSCCs, pois esses processos não são inibidos pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e pelo cAMP. A absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nessa espécie envolve as vias 1 e 2, que atuam sob salinidade baixa ( $\text{NaCl}$  25 mM) e salinidade elevada ( $\text{NaCl}$  150 mM), respectivamente. A via 1 deve depender dos transportadores de  $\text{K}^+$  da família HKT, por ser sensível a  $\text{Ba}^{2+}$  e insensível a tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ ) e  $\text{Cs}^+$ , enquanto a via 2 deve ser mediada pelos canais de  $\text{K}^+$  da família AKT/KAT, pois é sensível a  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{TEA}^+$  e  $\text{Cs}^+$  (WANG *et al.*, 2007).

A despeito do transporte de  $\text{Na}^+$  ser mediado por canais de  $\text{K}^+$  nas raízes de uma espécie halófita (WANG *et al.*, 2007), o papel desses canais na absorção de  $\text{Na}^+$  em espécies glicófitas, especialmente em plantas cultivadas, ainda permanece incerto. Assim sendo, o objetivo desse trabalho é investigar a contribuição relativa dos NSCCs e dos canais e transportadores de  $\text{K}^+$  na absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi. A escolha dessa espécie como modelo experimental baseia-se no seu amplo cultivo em regiões áridas e semi-áridas freqüentemente submetidas ao estresse salino (EHLERS; HALL, 1997). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a absorção de  $\text{Na}^+$  pelas raízes dessa espécie é principalmente mediada pelos NSCCs e pelos canais de  $\text{K}^+$ , havendo a contribuição dos transportadores de  $\text{K}^+$  sensíveis ao  $\text{NH}_4^+$ , especialmente quando as plantas são crescidas na ausência do  $\text{NH}_4^+$ . A participação desses transportadores nas vias de absorção de  $\text{Na}^+$  sensível e insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  é discutida.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Material vegetal

As sementes de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivar Pitiúba foram coletadas de plantas cultivadas no campo experimental do Setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará. As vagens secas foram colhidas e debulhadas manualmente e as sementes foram uniformizadas com o uso de peneiras com orifícios de 6 mm de diâmetro. Os estoques foram mantidos em câmara fria a 10°C e 45% de UR e renovados a cada seis meses.

A germinação das sementes foi conduzida em sistema de rolo (VIEIRA; CARVALHO, 1994). Para tanto, as sementes foram desinfetadas com NaClO 0,2% (m/v) por 5 min sob agitação eventual, lavadas três vezes e embebidas por 30 min em água destilada deionizada. Em seguida, as sementes foram distribuídas em folhas de papel Germitest<sup>®</sup> (280 x 380 mm) umedecidas com água destilada deionizada na proporção de duas vezes e meia a massa do papel. Dez sementes foram distribuídas em fileira no terço superior de duas folhas sobrepostas. Outra folha foi utilizada para cobrir as sementes e as três folhas foram enroladas. Três rolos, contendo 10 sementes cada, foram enrolados com uma folha adicional. Esse sistema foi envolvido com dois sacos plásticos transparentes desinfetados com etanol 70% (v/v), os quais foram dispostos em direções opostas e fixados com atilho. As sementes foram mantidas em condições controladas ( $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 h,  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por quatro dias.

Plântulas de quatro dias em estágio de gancho plumular foram transferidas para bandejas plásticas com 20 L de solução nutritiva completa (HOAGLAND; ARNON, 1950) contendo  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  625  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  250  $\mu\text{M}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KNO}_3$  500  $\mu\text{M}$ , Fe-EDTA 25  $\mu\text{M}$  e micronutrientes ( $\text{HBO}_3$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2$  2,25  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  0,75  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  1,75  $\mu\text{M}$  e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0,025  $\mu\text{M}$ ), pH 6,0. Para a obtenção de plantas privadas de  $\text{NH}_4^+$ , essa solução foi alterada para  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  750  $\mu\text{M}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KNO}_3$  500  $\mu\text{M}$ , Fe-EDTA 25  $\mu\text{M}$  e micronutrientes, pH 6,0. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação por sete dias.

## 2.2.2 Experimentos de influxo de Na<sup>+</sup>

Para caracterizar as vias para a absorção Na<sup>+</sup> por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi, foram realizados experimentos de influxo utilizando a técnica de raízes destacadas (HUANG *et al.*, 1992). Para tanto, plantas de onze dias com a primeira folha trifoliolada expandida foram utilizadas nos experimentos. As plantas foram coletadas e as raízes foram destacadas da parte aérea e lavadas em CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM à temperatura ambiente por 4 min. Em seguida, as raízes foram secadas suavemente com papel toalha e foram transferidas para frascos de Erlenmeyer com 50 mL de meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM e demais adições, de acordo com o experimento. Para testar o efeito do tempo, as raízes foram mantidas em meio de incubação adicionado de NaCl 50 mM a 30°C por 0, 20, 40, 60, 80 e 100 min. Quando a dose de NaCl foi testada, as raízes foram tratadas com meio de incubação suplementado com NaCl 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mM a 30°C por 30 min.

Para testar o efeito do Ca<sup>2+</sup>, as raízes foram lavadas em CaCl<sub>2</sub> 0, 0,1, 0,5, 1 e 2 mM à temperatura ambiente por 4 min. Em seguida, as raízes foram expostas a meio de incubação contendo NaCl 50 mM e as mesmas concentrações de Ca<sup>2+</sup> utilizadas nas lavagens, sendo mantidas a 30°C por 1 h. Quando K<sup>+</sup>, inibidores de canais de cátions e bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> foram testados, as raízes foram lavadas em CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM adicionado de concentrações crescentes desses compostos, à temperatura ambiente por 4 min. Logo depois, as raízes foram mantidas em meio de incubação acrescido de NaCl 50 mM e das mesmas concentrações de K<sup>+</sup> ou inibidores usados nas lavagens, permanecendo a 30°C por 1 h. Para testar o efeito de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, as raízes de plantas privadas e supridas de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram lavadas em CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM adicionado de concentrações crescentes desse cátion, à temperatura ambiente por 4 min. Em seguida, as raízes foram tratadas com meio de incubação contendo NaCl 50 mM e as mesmas concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> utilizadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 1 h. Ao final de todos os experimentos, as raízes foram lavadas em CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM gelado (2-4°C) por 4 min para deslocamento do Na<sup>+</sup> apoplástico e foram secadas a 70°C por 48 h. O influxo de Na<sup>+</sup> foi calculado a partir da acumulação de Na<sup>+</sup> nos tecidos em comparação com raízes não tratadas com NaCl.

### 2.2.3 Determinação de Na<sup>+</sup>

As amostras secas das raízes foram pulverizadas com gral e pistilo e armazenadas em tubos plásticos fechados à temperatura ambiente até a determinação do conteúdo de Na<sup>+</sup>. Amostras de 50 mg de massa seca pulverizada foram extraídas com 10 mL de água destilada deionizada a 100°C por 60 min em tubos hermeticamente fechados. Depois do resfriamento, os extratos foram filtrados em algodão e as leituras foram realizadas em fotômetro de chama (Micronal, modelo B462) calibrado com solução padrão de Na<sup>+</sup> 50 ppm.

### 2.2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos conforme delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. Cada repetição consistia em um frasco contendo um sistema radicular individual. Os resultados obtidos nos experimentos de tempo e dose de NaCl foram analisados por regressão não-linear. Os resultados dos demais experimentos foram submetidos à análise de variância seguida do teste de comparação de médias de Tukey ao nível de significância de 5%.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Caracterização cinética da absorção de Na<sup>+</sup> por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi

Os experimentos de influxo de Na<sup>+</sup> em função do tempo de exposição ao Na<sup>+</sup> e da dose aplicada foram conduzidos para caracterizar cineticamente a absorção de Na<sup>+</sup> por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi. O efeito do tempo de exposição ao Na<sup>+</sup> 50 mM foi analisado por regressão não-linear e possibilitou o ajuste dos valores obtidos à função do tipo hipérbole retangular ( $R^2 = 0,98$ ). De acordo com essa análise, a acumulação de Na<sup>+</sup> nas raízes aumentou progressivamente até 40 min de exposição e alcançou a saturação a partir desse período (Fig. 2.1). Com base nesses resultados, o tempo de exposição de 30 min foi escolhido para testar o efeito da dose de Na<sup>+</sup>, porque períodos mais prolongados poderiam acarretar a

estabilização do influxo de  $\text{Na}^+$ , principalmente em concentrações externas mais elevadas. Além disso, tempos de exposição mais curtos poderiam reduzir significativamente a acumulação de  $\text{Na}^+$  nas raízes, dificultando a verificação de alterações no influxo de  $\text{Na}^+$  em função do aumento da concentração externa desse cátion. Para os demais experimentos, os tratamentos foram realizados durante 60 min, pois esse período permitiria a constatação de efeitos inibitórios de diferentes cátions e fármacos sobre o influxo líquido máximo verificado nas condições experimentais utilizadas.

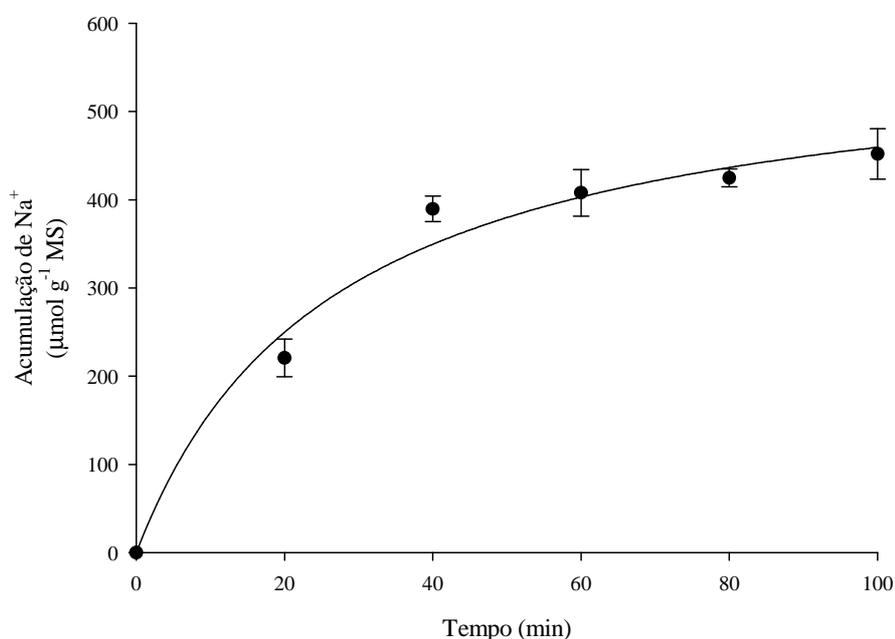


Figura 2.1 – Efeito do tempo de exposição ao  $\text{Na}^+$  externo sobre a acumulação de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi. As plantas foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) por sete dias em casa de vegetação. Em seguida, as plantas foram coletadas e as raízes foram destacadas da parte aérea e lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM à temperatura ambiente por 4 min. essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM e  $\text{NaCl}$  50 mM, permanecendo a 30°C por 0, 20, 40, 60, 80 e 100 min. Os pontos representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. A análise dos resultados por regressão não-linear permitiu o seu ajuste à função do tipo hipérbola retangular ( $R^2 = 0,98$ ).

O efeito da dose de  $\text{Na}^+$  aplicada foi analisado por regressão não-linear e permitiu o ajuste dos valores encontrados ao modelo de Michaelis-Menten, descrito pela função do tipo hipérbola retangular ( $R^2 = 0,98$ ). Considerando essa análise, o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  apresentou incremento significativo de acordo com o aumento da concentração externa de  $\text{Na}^+$ , estabilizando

a partir de 80 mM (Fig. 2.2). Assim sendo, a absorção de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi apresentou cinética de saturação. Utilizando o modelo de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco), foi possível ajustar os valores transformados à função polinomial do tipo linear ( $R^2 = 0,98$ ) e estimar as constantes cinéticas  $V_{\text{máx}}$  e  $K_m$  em  $7,16 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$  e 33 mM, respectivamente.

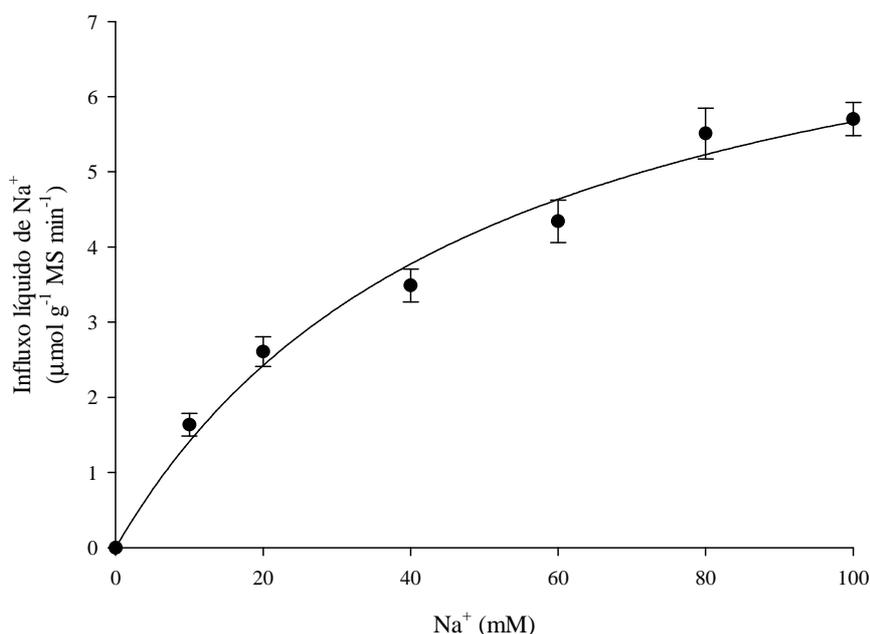


Figura 2.2 – Efeito da concentração externa de  $\text{Na}^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi. As raízes destacadas foram lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM à temperatura ambiente por 4 min. Essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM e NaCl 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mM, permanecendo a  $30^\circ\text{C}$  por 30 min. Os pontos representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. A análise dos resultados por regressão não-linear permitiu o seu ajuste à função do tipo hipérbole retangular ( $R^2 = 0,98$ ). As constantes cinéticas  $V_{\text{máx}}$  e  $K_m$  foram estimadas em  $7,16 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$  e 33 mM, respectivamente.

### 2.3.2 A absorção de $\text{Na}^+$ é parcialmente inibida por $\text{Ca}^{2+}$ e bloqueada por $\text{K}^+$

O efeito inibitório de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi foi investigado por meio de tratamentos com concentrações externas crescentes desse cátion. O tratamento com  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM diminuiu significativamente o influxo líquido de  $\text{Na}^+$ , causando 22% de inibição em relação ao controle (Fig. 2.3). Embora os tratamentos com  $\text{Ca}^{2+}$  0,5, 1 e 2 mM não apresentaram diferenças significativas entre si, eles

ocasionaram 57% de inibição do influxo líquido de  $\text{Na}^+$  em comparação com o controle. Esses resultados evidenciaram que a absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi foi mediada por um componente majoritário sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  e um componente minoritário insensível a esse cátion. O componente sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  foi completamente inibido por concentrações externas desse cátion acima de 0,5 mM. Além disso, os resultados mostraram também que o efeito inibitório do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a absorção de  $\text{Na}^+$  não foi competitivo. De fato, as concentrações utilizadas nos diferentes tratamentos não poderiam provocar efeito competitivo, pois a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM, por exemplo, causou 22% de inibição do influxo líquido de  $\text{Na}^+$ , mesmo sendo 500 vezes menor que a concentração externa de  $\text{Na}^+$  utilizada ( $\text{Na}^+$  50 mM).

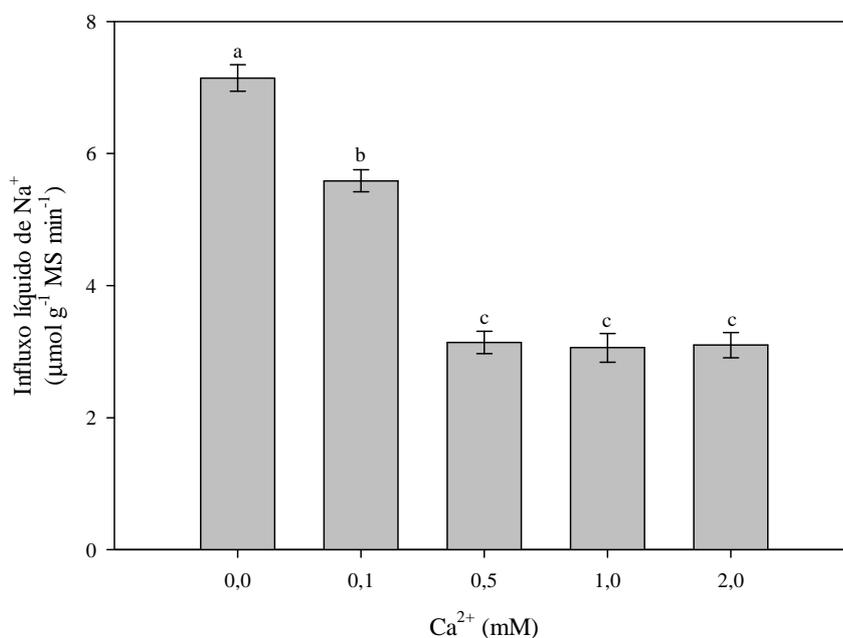


Figura 2.3 – Efeito da concentração externa de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi. As raízes destacadas foram lavadas em água destilada deionizada ou em  $\text{CaCl}_2$  0,1, 0,5, 1 ou 2 mM à temperatura ambiente por 4 min. Essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0, NaCl 50 mM e as mesmas concentrações de  $\text{CaCl}_2$  usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Com o intuito de verificar o efeito competitivo de  $\text{K}^+$  sobre a absorção de  $\text{Na}^+$ , foram conduzidos tratamentos com  $\text{K}^+$  12,5, 25, 50 e 100 mM, equivalentes a um quarto, um meio, uma vez e duas vezes a concentração externa de  $\text{Na}^+$  testada ( $\text{Na}^+$  50 mM), respectivamente. Assim sendo, foi constatada diminuição progressiva do influxo líquido de  $\text{Na}^+$  conforme o aumento da

concentração externa de  $K^+$  (Fig. 2.4). O tratamento com  $K^+$  12,5 mM, correspondente a apenas um quarto da concentração externa de  $Na^+$ , acarretou 25% de inibição em relação ao controle. Comparativamente, o tratamento com  $K^+$  100 mM, equivalente ao dobro da concentração externa de  $Na^+$ , praticamente bloqueou o influxo líquido de  $Na^+$ , pois causou até 98% de inibição em referência ao controle. Considerando que os tratamentos com  $K^+$  foram conduzidos na presença de  $Ca^{2+}$  0,1 mM, concentração que não inibiu completamente o componente sensível a esse cátion, os resultados obtidos indicaram que concentrações elevadas de  $K^+$  inibiram intensamente o componente sensível e insensível ao  $Ca^{2+}$ . Ainda, a diminuição do influxo líquido de  $Na^+$  ocorreu devido ao efeito competitivo de  $K^+$  porque o aumento proporcional da concentração externa de  $K^+$  em relação à concentração externa de  $Na^+$  exibiu forte efeito inibitório.

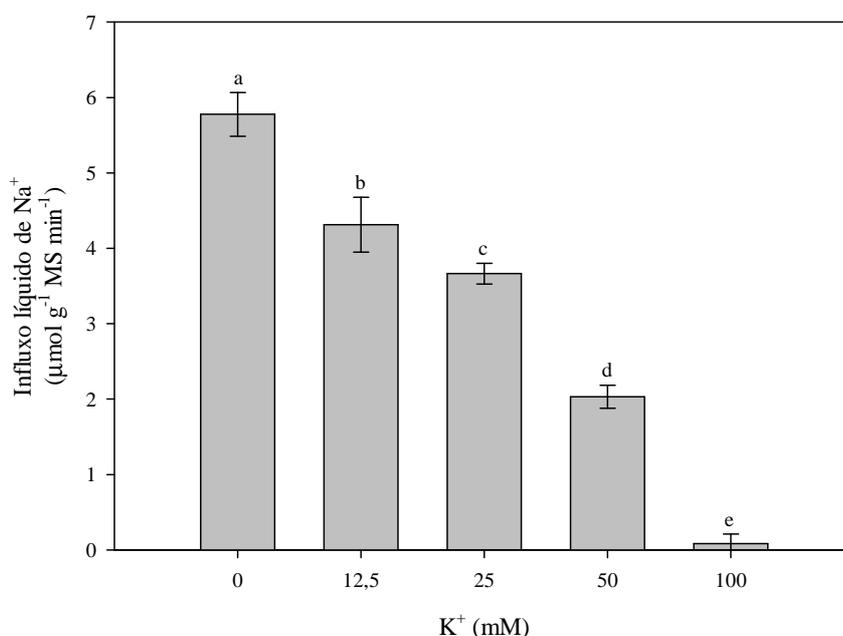


Figura 2.4 – Efeito da concentração externa de  $K^+$  sobre o influxo líquido de  $Na^+$  nas raízes de feijão caupi. As raízes destacadas foram lavadas em  $CaCl_2$  0,1 mM sem KCl ou com KCl 12,5, 25, 50 ou 100 mM, à temperatura ambiente por 4 min. Essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $CaCl_2$  0,1 mM, NaCl 50 mM e as mesmas concentrações de KCl usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Os efeitos interativos de  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  sobre a absorção de  $Na^+$  foram confirmados com tratamentos combinados desses cátions. Além do tratamento independente com  $Ca^{2+}$  1 mM, que

aboliu o componente sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ , foram conduzidos tratamentos combinados de  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM com  $\text{K}^+$  25 ou 50 mM, concentrações de  $\text{K}^+$  que não causaram o bloqueio total do influxo de  $\text{Na}^+$ . Enquanto o tratamento independente com  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM ocasionou somente 57% de inibição do influxo líquido de  $\text{Na}^+$  em comparação com o controle, os tratamentos combinados de  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM com  $\text{K}^+$  25 ou 50 mM ocasionaram 63 e 79% de inibição, respectivamente (Fig. 3.5). Esses resultados indicaram o efeito inibitório aditivo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  sobre a absorção de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi, evidenciando que o componente insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  foi competitivamente inibido pelo  $\text{K}^+$ .

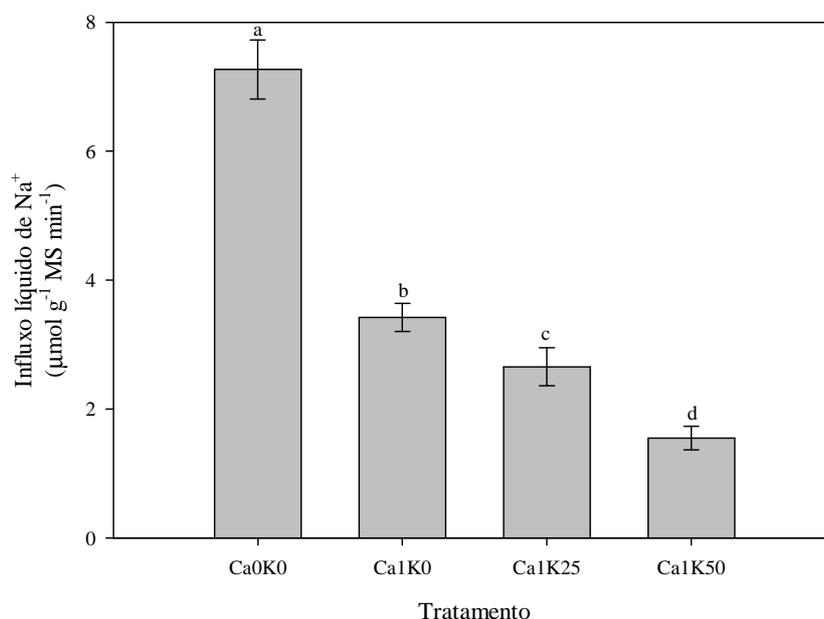


Figura 2.5 – Efeitos interativos da concentração externa de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi. As raízes destacadas foram lavadas em água destilada deionizada (Ca0K0), em  $\text{CaCl}_2$  1 mM sem KCl (Ca1K0), com KCl 25 mM (Ca1K25) ou com KCl 50 mM (Ca1K50), à temperatura ambiente por 4 min. Essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0, NaCl 50 mM e as mesmas concentrações de  $\text{CaCl}_2$  e KCl usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

### 2.3.3 Inibição farmacológica da absorção de $\text{Na}^+$ por inibidores de canais de cátions

Para verificar a contribuição relativa de canais de cátions na absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi, foram conduzidos experimentos com

flufenamato (Flu), um inibidor de NSCCs em animais, e quinino, um bloqueador inespecífico de canais de cátions. O aumento da concentração externa de ambos os fármacos causou diminuição significativa do influxo líquido de  $\text{Na}^+$  (Fig. 2.6). Os tratamentos com Flu 0,05 e 0,1 mM ocasionaram 39 e 61% de inibição, respectivamente, em relação ao controle. Efeitos mais drásticos sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  foram verificados para os tratamentos com quinino de 1 e 2 mM, os quais acarretaram 54 e 97% de inibição, respectivamente, em comparação com o controle. Dessa maneira, a absorção de  $\text{Na}^+$  em raízes de feijão caupi foi intensamente reduzida com a inibição dos NSCCs e foi praticamente abolida com o bloqueio inespecífico dos canais de cátions.

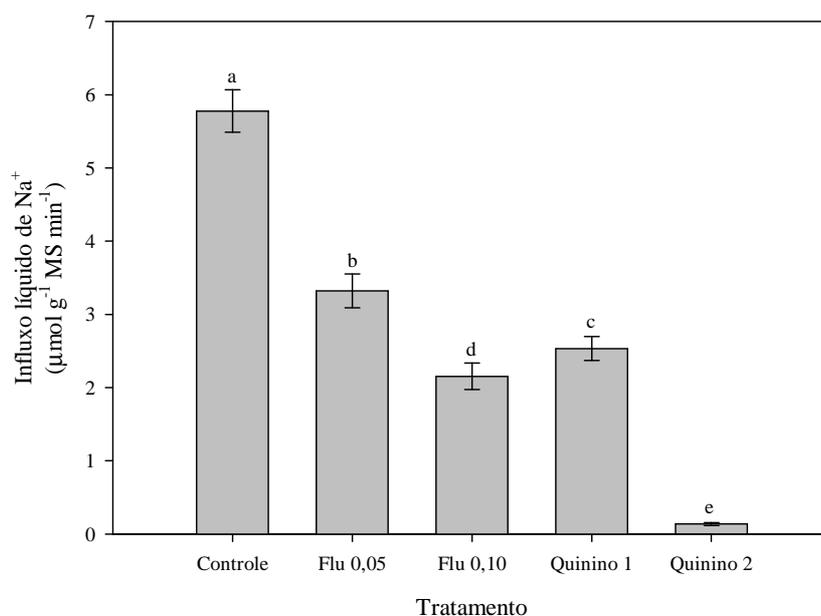


Figura 2.6 – Efeito de inibidores de canais de cátions sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi. As raízes destacadas foram lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM sem inibidores, com Flu 0,05 e 0,10 mM ou com quinino 1 e 2 mM, à temperatura ambiente por 4 min. Essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM, NaCl 50 mM e as mesmas concentrações de inibidores usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Para determinar o envolvimento dos canais de  $\text{K}^+$  na absorção de  $\text{Na}^+$ , os bloqueadores específicos tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ ) e  $\text{Cs}^+$  foram utilizados. O tratamento com  $\text{TEA}^+$  10 mM não

causou efeito significativo sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  em referência ao controle, mas o dobro da concentração desse fármaco ( $\text{TEA}^+$  20 mM) ocasionou 27% de inibição (Fig. 2.7). Em comparação, o aumento da concentração externa de  $\text{Cs}^+$  reduziu progressivamente o influxo líquido de  $\text{Na}^+$ , pois as concentrações de 0,1 e 1 mM provocaram 12 e 30% de inibição, respectivamente, em relação ao controle. Inesperadamente, o bloqueio dos canais de  $\text{K}^+$  acarretou a inibição parcial do influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi.

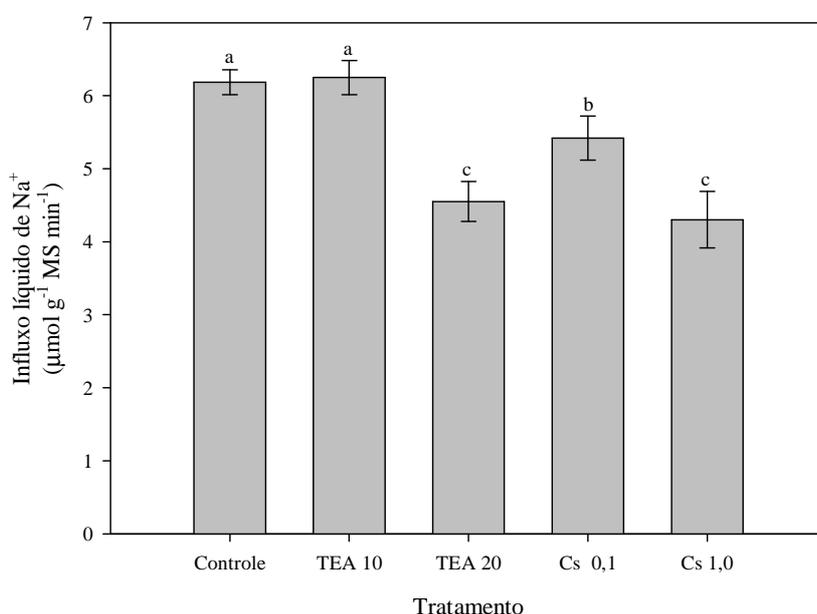


Figura 2.7 – Efeito de bloqueadores de canais de  $\text{K}^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi. As raízes destacadas foram lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM sem bloqueadores, com  $\text{TEA}^+$  10 e 20 mM ou com  $\text{CsCl}$  0,1 e 1,0 mM, à temperatura ambiente por 4 min. Essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM,  $\text{NaCl}$  50 mM e as mesmas concentrações de bloqueadores usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Com o objetivo de constatar os efeitos interativos de Flu,  $\text{TEA}^+$  e  $\text{Cs}^+$  sobre a absorção de  $\text{Na}^+$ , foram conduzidos tratamentos combinados desses inibidores farmacológicos. Além dos tratamentos independentes com Flu 0,1 mM,  $\text{TEA}^+$  20 mM ou  $\text{Cs}^+$  1 mM, que causaram a inibição máxima sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$ , foram utilizados também os tratamentos combinados de Flu 0,1 mM com  $\text{TEA}^+$  20 mM ou  $\text{Cs}^+$  1 mM. Os tratamentos independentes com Flu 0,1 mM,  $\text{TEA}^+$  20 mM ou  $\text{Cs}^+$  1 mM ocasionaram 61, 27 e 30% de inibição do influxo

líquido de  $\text{Na}^+$ , respectivamente, em relação ao controle. No entanto, o tratamento combinado de Flu 0,1 mM com  $\text{TEA}^+$  20 mM quase bloqueou o influxo líquido de  $\text{Na}^+$ , acarretando até 95% de inibição (Fig. 2.8). Inversamente, o tratamento combinado de Flu 0,1 mM com  $\text{Cs}^+$  1 mM provocou apenas 37% de inibição em comparação com o controle, sendo significativamente menos eficaz que o tratamento com Flu 0,1 mM somente (61% de inibição), mas mais eficiente que o tratamento independente com  $\text{Cs}^+$  1 mM (30% de inibição). Esses resultados demonstraram que Flu e  $\text{TEA}^+$  causaram efeitos inibitórios sinérgicos, agindo sobre vias distintas para a absorção de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi. Comparativamente,  $\text{Cs}^+$  apresentou efeito antagônico em relação ao Flu, diminuindo a inibição causada por esse fármaco, mas Flu demonstrou efeito sinérgico com relação ao  $\text{Cs}^+$ , aumentando inibição da absorção de  $\text{Na}^+$  em referência ao tratamento independente com esse cátion.

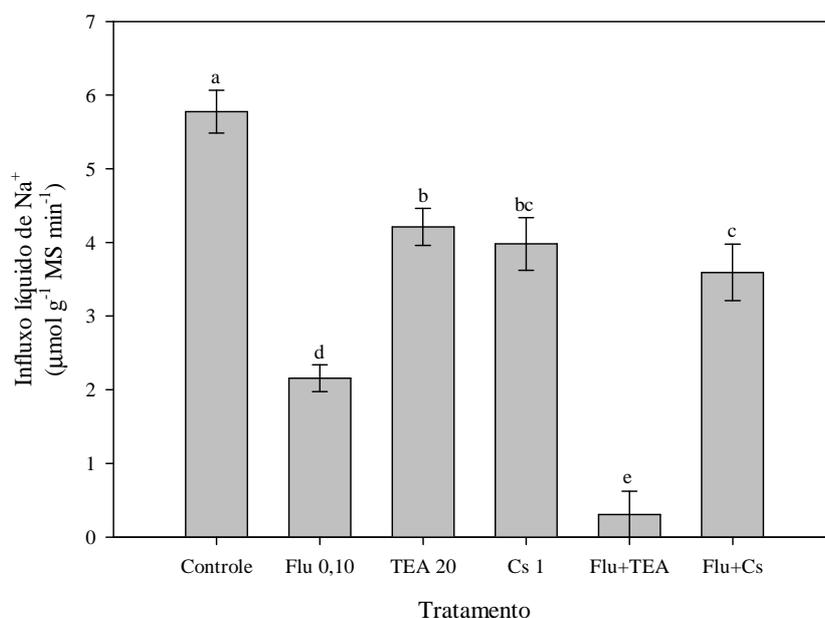


Figura 2.8 – Efeitos interativos de inibidores de canais de cátions e bloqueadores de canais de  $\text{K}^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi. As raízes destacadas foram lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM sem adições, com Flu 0,10 mM,  $\text{TEA}^+$  20 mM,  $\text{CsCl}$  1,0 mM, Flu 0,01 mM e  $\text{TEA}^+$  20 mM (Flu+TEA) ou Flu 0,01 mM e  $\text{CsCl}$  1,0 mM (Flu+Cs), à temperatura ambiente por 4 min. Essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM,  $\text{NaCl}$  50 mM e as mesmas concentrações de inibidores usadas nas lavagens, permanecendo a  $30^\circ\text{C}$  por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

### 2.3.4 A absorção de $\text{Na}^+$ é parcialmente inibida pelo $\text{NH}_4^+$ , principalmente em plantas crescidas na ausência do $\text{NH}_4^+$

Plantas crescidas na ausência e na presença do  $\text{NH}_4^+$  foram usadas em experimentos de influxo de  $\text{Na}^+$  para determinar o efeito inibitório do  $\text{NH}_4^+$  sobre a absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi. O influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes privadas do  $\text{NH}_4^+$  não diferiu significativamente daquele verificado para as raízes crescidas na presença desse cátion (Fig. 2.9). Os tratamentos com  $\text{NH}_4^+$  2,5 e 5,0 mM acarretaram apenas 14% de inibição do influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes crescidas na presença do  $\text{NH}_4^+$ , em comparação com o controle. Entretanto, os mesmos tratamentos causaram até 32% de inibição nas raízes privadas do  $\text{NH}_4^+$ , com relação ao controle. Desse modo, o  $\text{NH}_4^+$  apresentou efeito inibitório sobre a absorção de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi, o qual foi mais pronunciado nas raízes privadas do  $\text{NH}_4^+$ .

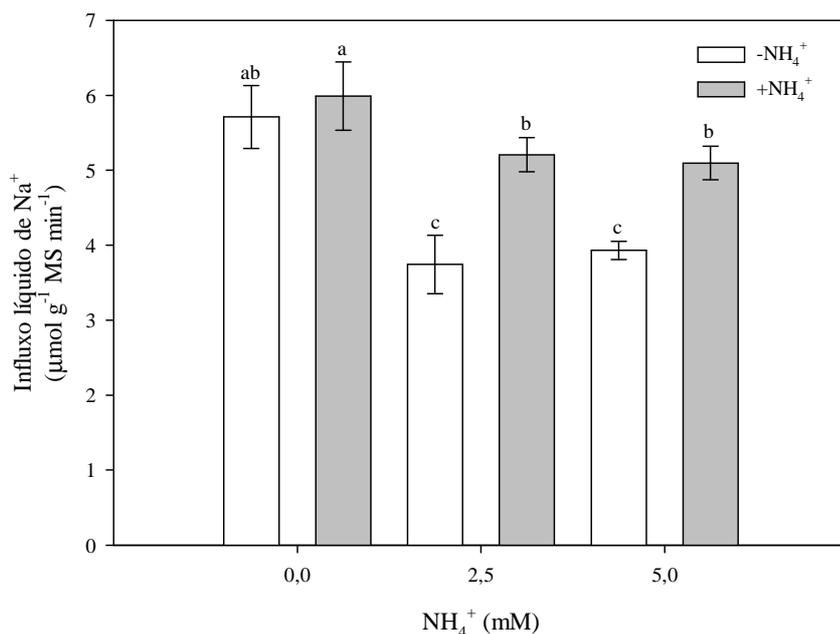


Figura 2.9 – Efeito da concentração externa de  $\text{NH}_4^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi crescidas na ausência ou na presença de  $\text{NH}_4^+$ . As plantas foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) ou modificada sem  $\text{NH}_4^+$  (conforme Material e Métodos) por sete dias em casa de vegetação. Em seguida, as plantas foram coletadas e as raízes foram destacadas da parte aérea e lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM sem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2,5 e 5,0 mM, à temperatura ambiente por 4 min. Essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM, NaCl 50 mM e as mesmas concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

## 2.4 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, as vias para a absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade são caracterizadas fisiologicamente nas raízes de feijão caupi cultivar Pitiúba. O efeito da concentração externa de  $\text{Na}^+$  sobre o influxo líquido desse cátion mostra que a absorção de  $\text{Na}^+$  apresenta cinética de saturação similar àquela descrita para cevada (RAINS; EPSTEIN, 1967a; RAINS; EPSTEIN, 1967b), porém diferente daquela verificada em algodão (CRAMER *et al.*, 1987), a qual apresenta padrão não-saturável.

O valor de  $V_{\text{máx}}$  estimado em  $7,16 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$  para as raízes de feijão caupi é superior aos valores verificados para cevada (RAINS; EPSTEIN, 1967a) e *S. maritima* (WANG *et al.*, 2007), os quais correspondem a  $0,5$  e  $1,4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$ , respectivamente. Essas diferenças possivelmente se devem ao fato de que os valores de  $V_{\text{máx}}$  em cevada e *S. maritima* são calculados em base de massa fresca, enquanto o valor de  $V_{\text{máx}}$  para feijão caupi é estimado em referência à massa seca. Assumindo que a massa seca nas raízes de feijão caupi corresponde a aproximadamente 5% da massa fresca (resultado não mostrado), o valor de  $V_{\text{máx}}$  para essa espécie pode ser corrigido para  $0,36 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$ , o qual se aproxima daqueles verificados para cevada e *S. maritima*.

O valor de  $K_m$  estimado em 33 mM para as raízes de feijão caupi também difere daqueles constatados para cevada (RAINS; EPSTEIN, 1967a) e *S. maritima* (WANG *et al.*, 2007), equivalentes a 5 e 80 mM, respectivamente. Considerando que o feijão caupi habita solos salinizados (EHLERS; HALL, 1997), assim como a halófita *S. marítima*, valores mais elevados de  $K_m$  são esperados para essas espécies, pois as vias para a absorção de  $\text{Na}^+$  possivelmente apresentam baixa afinidade por esse cátion, o qual é encontrado em concentrações elevadas nesses ambientes.

### 2.4.1 A absorção de $\text{Na}^+$ nas raízes de feijão caupi é mediada por uma via sensível e uma via insensível ao $\text{Ca}^{2+}$

Como esperado, o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi é parcialmente inibido com o aumento da concentração externa de  $\text{Ca}^{2+}$ , evidenciando que a absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nessa espécie é mediada por uma via sensível e uma via

insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A via sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  é a principal, uma vez que medeia quase 60% do influxo de  $\text{Na}^+$ . Nas raízes de cevada (RAINS; EPSTEIN, 1967b), algodão (CRAMER *et al.*, 1987), pimenta (RUBIO *et al.*, 2003) e *A. thaliana* (ESSAH *et al.*, 2003), o influxo de  $\text{Na}^+$  também é parcialmente inibido por concentrações externas crescentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando igualmente o envolvimento de uma via sensível e uma via insensível a esse cátion. No entanto, concentrações milimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  são necessárias para reduzir brandamente o influxo de  $\text{Na}^+$  nas raízes de cevada (RAINS; EPSTEIN, 1967b) e algodão (CRAMER *et al.*, 1987). Em comparação, o influxo de  $\text{Na}^+$  nas raízes de pimenta (RUBIO *et al.*, 2003) e *A. thaliana* (ESSAH *et al.*, 2003) é fortemente inibido por concentrações micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrando que a absorção de  $\text{Na}^+$  nessas espécies, assim como no feijão caupi, é principalmente mediada por uma via sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ .

A inibição parcial da absorção de  $\text{Na}^+$  pelo  $\text{Ca}^{2+}$  externo nas raízes de feijão caupi corrobora os resultados de trabalhos que indicam o alívio dos efeitos danosos do estresse salino em plantas tratadas com concentrações externas crescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (REID; SMITH, 2000; SHABALA *et al.*, 2003; MELGAR *et al.*, 2006; TUNA *et al.*, 2007). O  $\text{Ca}^{2+}$  estabiliza as membranas celulares devido a interações eletrostáticas com as cargas negativas dos fosfolipídeos de membrana, evitando o vazamento de eletrólitos (CRAMER *et al.*, 1985; MENGLE; KIRKBY, 2001). Além disso, o  $\text{Ca}^{2+}$  mantém a elevada seletividade  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  das membranas celulares, restringindo a absorção de  $\text{Na}^+$  e mantendo a captação de  $\text{K}^+$  (EPSTEIN, 1961; DAVENPORT *et al.*, 1997). Dessa forma, a redução da absorção de  $\text{Na}^+$  consiste em um dos mecanismos pelos quais o  $\text{Ca}^{2+}$  externo pode aliviar os distúrbios causados pelo estresse salino sobre as plantas.

Os efeitos interativos de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi indicam que o  $\text{K}^+$  externo exerce efeito competitivo tanto sobre a via sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  quanto sobre a via insensível. O tratamento com  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM não inibe completamente a via sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.3), mas o tratamento combinado de  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM com  $\text{K}^+$  100 mM praticamente bloqueia o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  (Fig. 2.4), indicando que a via sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  é inibida por  $\text{K}^+$ . Em comparação, o tratamento com  $\text{Ca}^{2+}$  1,0 mM abole a via sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.3) e o tratamento combinado de  $\text{Ca}^{2+}$  1,0 mM com  $\text{K}^+$  25 ou 50 mM aumenta a inibição sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  (Fig. 2.5), demonstrando que a via insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  também é inibida pelo  $\text{K}^+$ . O efeito competitivo de  $\text{K}^+$  sobre a absorção de  $\text{Na}^+$  já havia sido demonstrado nas raízes de cevada (RAINS; EPSTEIN, 1967a; RAINS; EPSTEIN, 1967b), milho (JACOBY; HANSON,

1985), algodão (CRAMER *et al.*, 1987), pimenta (RUBIO *et al.*, 2003), *A. thaliana* (ESSAH *et al.*, 2003) e *S. maritima* (WANG *et al.*, 2007). Esse efeito está relacionado à similaridade físico-química entre  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , a qual propicia a competição desses cátions pelos sítios de ligação nos transportadores de membrana (MAATHUIS; AMTMANN, 1999).

#### 2.4.2 A via sensível ao $\text{Ca}^{2+}$ deve ser mediada pelos NSCCs

A inibição farmacológica do influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi demonstra fortemente que os canais de cátions exercem papel central na absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nessa espécie. De fato, o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  é quase abolido pelo tratamento com quinino 2 mM, um bloqueador inespecífico dos canais de cátions. Adicionalmente, o tratamento com Flu 0,1 mM, um inibidor de NSCCs em animais, inibe 61% do influxo líquido de  $\text{Na}^+$ . Em comparação, os tratamentos com Flu 0,1 mM e quinino 1 mM, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  0,2 mM, inibem o influxo instantâneo de  $\text{Na}^+$  nas raízes de *A. thaliana* em 56 e 53%, respectivamente (ESSAH *et al.*, 2003). NSCCs sensíveis a flufenamato são encontrados nas raízes de trigo (BUSCHMANN *et al.*, 2000), assim como os NSCCs das raízes de *A. thaliana* são bloqueados por quinino (DEMIDCHIK; TESTER, 2002). De acordo com essas evidências, os NSCCs devem consistir nos principais transportadores que medeiam a via para a absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi.

A inibição máxima do influxo líquido de  $\text{Na}^+$  por Flu e  $\text{Ca}^{2+}$  nas raízes de feijão caupi é alcançada com Flu 0,1 mM (na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM) e com  $\text{Ca}^{2+}$  0,5 mM, causando 61 e 57% de inibição, nessa ordem. Comparativamente, a inibição máxima do influxo instantâneo de  $\text{Na}^+$  nas raízes de *A. thaliana* é atingida com Flu 0,1 mM (na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  0,2 mM) e com  $\text{Ca}^{2+}$  3,0 mM, acarretando 56% de inibição (ESSAH *et al.*, 2003). A coincidência entre esses resultados pode indicar que Flu e  $\text{Ca}^{2+}$  atuam sobre as mesmas vias para a absorção de  $\text{Na}^+$  nessas espécies. O efeito inibitório de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a absorção de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi pode estar relacionado ao bloqueio dos NSCCs, uma vez que correntes dependentes de  $\text{Na}^+$  mediadas por esses canais são fortemente inibidas por  $\text{Ca}^{2+}$  nas raízes de milho (ROBERTS; TESTER, 1997), trigo (DAVENPORT; TESTER, 2000; BUSCHMANN *et al.*, 2000) e *A. thaliana* (DEMIDCHIK; TESTER, 2002). Considerando essas evidências, NSCCs devem atuar na via para a absorção de  $\text{Na}^+$  sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  nas raízes de feijão caupi.

O efeito competitivo de  $K^+$  sobre a via para a absorção de  $Na^+$  sensível ao  $Ca^{2+}$  nas raízes de feijão caupi pode ser explicado pela baixa seletividade dos NSCCs em relação aos cátions monovalentes. Os NSCCs identificados nas raízes de trigo (DAVENPORT; TESTER, 2000) e *A. thaliana* (DEMIDCHIK; TESTER, 2002) apresentam seletividade relativa  $K^+/Na^+$  de 1,31 e 1,49, respectivamente. Presumindo que as raízes de feijão caupi apresentem NSCCs com seletividade  $K^+/Na^+$  semelhante, o aumento da concentração externa de  $K^+$  em relação à de  $Na^+$  poderia acarretar o transporte preferencial de  $K^+$ . Teoricamente, sob concentrações externas equivalentes de  $Na^+$  e  $K^+$ , o transporte de  $Na^+$  via NSCCs poderia ser reduzido à metade. Coincidentemente, o tratamento com  $K^+$  50 mM na presença de  $Na^+$  50 mM inibe 65% do influxo líquido de  $Na^+$  nas raízes de feijão caupi.

2.4.3 Os canais de  $K^+$  e os transportadores de  $K^+$  sensíveis ao  $NH_4^+$  devem mediar a via insensível ao  $Ca^{2+}$

A diminuição significativa do influxo líquido de  $Na^+$  pelos inibidores farmacológicos  $TEA^+$  e  $Cs^+$  indica fortemente o envolvimento dos canais de  $K^+$  na absorção de  $Na^+$  por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi. O  $TEA^+$  e o  $Cs^+$  são potentes bloqueadores dos KIRCs identificados nas raízes de milho (ROBERTS; TESTER, 1995), batata (ZIMMERMANN *et al.*, 1998), tomate (HARTJE *et al.*, 2000) e *A.thaliana* (IVASHIKINA *et al.*, 2001). A ação desses inibidores farmacológicos sobre os NSCCs nas raízes de feijão caupi é pouco provável, uma vez que os NSCCs caracterizados a partir das raízes de milho (ROBERTS; TESTER, 1997), trigo (BUSCHMANN *et al.*, 2000) e *A.thaliana* (DEMIDCHIK; TESTER, 2002) são insensíveis ao  $TEA^+$  e ao  $Cs^+$ . Além disso, a atuação dos canais de  $K^+$  na absorção de  $Na^+$  nas raízes da halófito *S. marítima* é sugerida com base no efeito inibitório do  $TEA^+$  e do  $Cs^+$  sobre o influxo instantâneo e a acumulação de  $Na^+$  (WANG *et al.*, 2007). A inibição quase completa do influxo líquido de  $Na^+$  nas raízes de feijão caupi pelo Flu (inibidor de NSCCs) aliado ao  $TEA^+$  (bloqueador de canais de  $K^+$ ) e pelo quinino (bloqueador inespecífico de canais de cátions), corrobora a contribuição central dos NSCCs e canais de  $K^+$  na entrada de  $Na^+$  no simplasto radicular dessa espécie.

A participação dos transportadores de  $K^+$  sensíveis ao  $NH_4^+$  nas vias para a absorção de  $Na^+$  por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi é evidenciada pelo efeito

inibitório do  $\text{NH}_4^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$ , principalmente nas raízes privadas do  $\text{NH}_4^+$ . A via sensível ao  $\text{NH}_4^+$  que medeia a absorção de  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta afinidade têm sido atribuída principalmente aos transportadores da família KT/HAK/KUP, incluindo HAK1 de cevada (SANTA-MARÍA *et al.*, 1997; SANTA-MARÍA *et al.*, 2000), arroz (BAÑUELOS *et al.*, 2002) e pimenta (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005). No entanto, os transportadores da família HKT, como HKT1 de cevada (SANTA-MARÍA *et al.*, 2000) e de *E. camaldulensis* (FAIRBAIRN *et al.*, 2001), também apresentam sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ . A participação dos transportadores dessa família na captação de  $\text{Na}^+$  pelas raízes é sugerida em *A. thaliana* (RUS *et al.*, 2001), arroz (HORIE *et al.*, 2007) e trigo (LAURIE *et al.*, 2002). Desse modo, o componente sensível ao  $\text{NH}_4^+$  que medeia a absorção de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi deve envolver transportadores de  $\text{K}^+$  das famílias KT/HAK/KUP e HKT.

A inibição competitiva causada por  $\text{K}^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{Na}^+$  nas raízes de feijão caupi, especialmente quando a via para a absorção de  $\text{Na}^+$  sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  está completamente inibida, é uma forte evidência de que os canais e transportadores de  $\text{K}^+$  medeiam a via insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A elevada seletividade  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  apresentada pelos KIRCs (AMTMANN; SANDERS, 1999) e transportadores de  $\text{K}^+$  da família KT/HAK/KUP (SANTA-MARÍA *et al.*, 1997; BAÑUELOS *et al.*, 2002) pode favorecer a ligação do  $\text{K}^+$  nesses transportadores, em detrimento da ligação de  $\text{Na}^+$ , ocasionando a inibição do transporte de  $\text{Na}^+$ . Além disso, concentrações externas de  $\text{Ca}^{2+}$  de até 2 mM inibem completamente a via para a absorção de  $\text{Na}^+$  sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  nas raízes de feijão caupi, mas não afetam a atividade dos KIRCs (ROBERTS; TESTER, 1995), HAKs (SANTA-MARÍA *et al.*, 2000; MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005) e HKTs (TYERMAN; SKERRETT, 1999; LIU *et al.*, 2001) em outras espécies, reforçando a participação desses transportadores na via insensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  nas raízes de feijão caupi. No entanto, a contribuição dos NSCCs nessa via não pode ser descartada, pois a atividade desses canais não é totalmente bloqueada com o aumento da concentração externa de  $\text{Ca}^{2+}$  (DAVENPORT; TESTER, 2000).

#### 2.4.4 Conclusão

De acordo com o modelo proposto (Fig. 2.10), os resultados do presente trabalho evidenciam que a absorção de  $\text{Na}^+$  por mecanismos de baixa afinidade nas raízes de feijão caupi



## 2.5 REFERÊNCIAS

APSE, M.P.; BLUMWALD, E. Na<sup>+</sup> transport in plants. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2247-2254, 2007.

AMTMANN, A.; SANDERS, D. Mechanisms of Na<sup>+</sup> uptake by plant cells. **Advances in Botanical Research**, v. 29, p. 75-112, 1999.

BAÑUELOS, M.A.; GARCIADEBLÁS, B.; CUBERO, B.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. **Plant Physiology**, v. 130, p. 784-795, 2002.

BUSCHMANN, P.H.; VAIDYANATHAN, R.; GASSMANN, W.; SCHROEDER, J.I. Enhancement of Na<sup>+</sup> uptake currents, time-dependent inward-rectifying K<sup>+</sup> channel currents, and K<sup>+</sup> channel transcripts by K<sup>+</sup> starvation in wheat root cells. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1387-1397, 2000.

CRAMER, G.R.; LÄUCHLI, A.; POLITO, V.S. Displacement of calcium by sodium from the plasmalemma of root cells: primary response to salt stress. **Plant Physiology**, v. 79, p. 207-211, 1985.

CRAMER, G.R.; LYNCH, J.; LÄUCHLI, A.; EPSTEIN, E. Influx of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> into roots of salt-stressed cotton seedlings: effects of supplemental Ca<sup>2+</sup>. **Plant Physiology**, v. 83, p. 510-516, 1987.

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

DAVENPORT, R.J.; REID, R.J.; SMITH, F.A. Sodium-calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 323-327, 1997

DEMIDCHIK, V.; ESSAH, P.A.; TESTER, M. Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. **Planta**, v. 219, p. 167-175, 2004.

DEMIDCHIK, V.; TESTER, M. Sodium fluxes through non-selective cation channels in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiology**, v. 128, p. 379-387, 2002.

EHLERS, J.D.; HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**, v. 53, p. 187-204, 1997.

ESSAH, P.A.; DAVENPORT, R.; TESTER, M. Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 133, p. 307-318, 2003.

EPSTEIN, E. The essential role of calcium in selective cation transport by plant cells. **Plant Physiology**, v. 36, p. 437-444, 1961.

FAIRBAIRN, D.J.; LIU, W.; SCHACHTMAN, D.P.; GOMEZ-GALLEGO, S.; DAY, S.R.; TEASDALE, R.D. Characterization of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 515-525, 2000.

GRASSMAN, W.; RUBIO, F.; SCHROEDER, J.I. Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. **Plant Journal**, v. 10, p. 869-952, 1996.

GOLLDAK, D.; QUIGLEY, F.; MICHALOWSKI, C.B.; KAMASANI, U.R.; BOHNERT, H.J. Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 71-81, 2003.

HARTJE, S.; ZIMMERMANN, S.; KLONUS, D.; MÜLLER-RÖBER, B. Functional characterization of LKT1, a K<sup>+</sup> uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel SKT1 after expression in *Xenopus oocytes*. **Planta**, v. 210, p. 723-731, 2000.

HIRSH, R.E.; LEWIS, B.D.; SPALDING, E.P.; SUSSMAN, M.R. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. **Science**, v. 280, p. 918-912, 1998.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-cultured method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station, circular n° 347, 1950.

HORIE, T.; YOSHIDA, K.; NAKAYAMA, H.; YAMADA, K.; OIKI, S.; SHINMYO, A. Two types of HKT transporters with different properties of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in *Oryza sativa*. **Plant Journal**, v. 27, p. 129-138, 2001.

HORIE, T.; COSTA, A.; KIM, T.H.; HAN, M.J.; HORIE, R.; LEUNG, H.-Y.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H.; AN, G.; SCHROEDER, J.I. Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. **EMBO Journal**, v. 26, p. 3003-3014, 2007.

HUANG, Z.-Z.; YAN, X.; JALIL, A.; NORLYN, J.D.; EPSTEIN, E. Short-term experiments on ion transport by seedlings and excised roots. **Plant Physiology**, v. 100, p. 1914-1920, 1992.

IVASHIKINA, N.; BECKER, D.; ACHE, P.; MEYERHOFF, O.; FELLE, H.H.; HEDRICH, R. K<sup>+</sup> channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. **FEBS Letters**, v. 508, p. 463-469, 2001.

JACOBY, B.; HANSON, J.B. Controls on <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> influx in corn roots. **Plant Physiology**, v. 77, p. 930-934, 1985.

LAURIE, S.; FEENEY, K.A.; MAATHUIS, F.J.M.; HEARD, P.J.; BROWN, S.J.; LEIGH, R.A. A role of HKT1 in sodium uptake by wheat roots. **Plant Journal**, v. 32, p. 139-149, 2002.

LIU, W.; FAIRBAIRN, D.J.; REID, R.J.; SCHACHTMAN, D.P. Characterization of two HKT1 homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capacity. **Plant Physiology**, v. 127, p. 283-294, 2001.

MAATHIUS, F.J.; AMTMANN, A.  $K^+$  nutrition and  $Na^+$  toxicity: the basis of cellular  $K^+/Na^+$  ratios. **Annals of Botany**, v. 84, p. 123-133, 1999.

MAATHUIS, F.J.M.; SANDERS, D. Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1617-1625, 2001.

MARTÍNEZ-CORDERO, M.A.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. High-affinity  $K^+$  uptake in pepper plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1553-1562, 2005.

MELGAR, J.C.; BENLLOCH, M.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. Calcium increases sodium exclusion in olive plants. **Scientia Horticulture**, v. 109, p. 303-305, 2006.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of Plant Nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.

NIEVES-CORDONES, M.; MARTÍNEZ-CORDERO, M.A.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. An  $NH_4^+$ -sensitive component dominates high-affinity  $K^+$  uptake in tomato plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 273-280, 2007.

RAINS, D.W.; EPSTEIN, E. Sodium absorption by barley roots: role of the dual mechanisms of alkali cation transport. **Plant Physiology**, v. 42, p. 314-318, 1967a.

RAINS, D.W.; EPSTEIN, E. Sodium absorption by barley roots: its mediation by mechanism 2 of alkali cation transport. **Plant Physiology**, v. 42, p. 319-323, 1967b.

REID, R.J.; SMITH, F.A. The limits of sodium/calcium interactions in plant growth. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 709-715, 2000.

ROBERTS, S.K.; TESTER, M. Inward and outward K<sup>+</sup>-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize root cortex and stele. **Plant Journal**, v. 8, p. 811-825, 1995.

ROBERTS, S.K.; TESTER, M. Patch clamp study of Na<sup>+</sup> transport in maize roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 431-440, 1997.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Potassium transport in fungi and plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 1-30, 2000.

RUBIO, F.; FLORES, P.; NAVARRO, J.M.; MARTINEZ, V. Effects of Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and cGMP on Na<sup>+</sup> uptake in pepper plants. **Plant Science**, v. 165, p. 1043-1049, 2003.

RUBIO, F.; SANTA-MARÍA, G.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Cloning of *Arabidopsis* and barley HAK potassium transporters in root and shoot cells. **Physiologia Plantarum**, v. 109, p. 34-43, 2000.

RUS, A.; YOKOL, S.; SHARKHUU, A.; REDDY, M.; LEE, B.; MATSUMOTO, T.K.; KOLWA, H.; ZHU, J.-K.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 14150-14155, 2001.

SANTA-MARÍA, G.E.; DANNA, C.H.; CZIBENER, C. High-affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and -insensitive pathways. **Plant Physiology**, v. 123, p. 297-306, 2000.

SANTA-MARÍA, G.E.; RUBIO, F.; DUBCOVSKY, J.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. **Plant Cell**, v. 9, p. 2281-2289, 1997.

SCHACHTMAN, D.P.; KUMAR, R.; SCHROEDER, J.I.; MARSH, E.L. Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 11079-11084, 1997.

SHABALA, S.; SHABALA, L.; VAN VOLKENBURGH, E. Effect of calcium on root development and root ion fluxes in salinised barley seedlings. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 507-514, 2003.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.

TUNA, A.L.; KAYA, C.; ASHRAF, M.; ALTUNLU, H.; YOKAS, I.; YAGMUR, B. The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 173-178, 2007.

TYERMAN, S.D.; SKERRETT, I.M. Root ion channels and salinity. **Scientia Horticulture**, v. 78, p. 175-235, 1999.

UOZOMI, N.; KIM, E.J.; RUBIO, F.; YAMAGUCHI, T.; MUTO, S.; TSUBOI, A.; BAKKER, E.P.; NAKAMURA, T.; SCHROEDER, J.I. The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na<sup>+</sup> currents in *Xenopus leavis* oocytes and Na<sup>+</sup> uptake in *Sccharomyces cerevisiae*. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1249-1259, 2000.

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

WANG, S.-M.; ZHANG, J.-L.; FLOWERS, T.J. Low-affinity Na<sup>+</sup> uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. **Plant Physiology**, v. 145, p. 559-571, 2007.

ZIMMERMANN, S.; TALKE1, I.; EHRHARDT, T.; NAST, G.; MÜLLER-RÖBER, B. Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. **Plant Physiology**, v. 116, p. 879-890, 1998.

## CAPÍTULO 3

SELETIVIDADE  $K^+/Na^+$  DOS MECANISMOS DE CARREGAMENTO DE  $Na^+$   
E  $K^+$  NA SEIVA DE XILEMA EM FEIJÃO CAUPI

### 3.1 INTRODUÇÃO

A resistência das plantas à salinidade elevada do solo é um fenômeno de alta relevância para a agricultura, devido à expansão das áreas salinizadas em todo o mundo, especialmente nos campos de cultivo irrigados. Os solos salinos apresentam elevada concentração de sais solúveis, geralmente o NaCl. Desta forma, a redução da produtividade agrícola sob salinidade elevada tem sido atribuída à toxicidade do Na<sup>+</sup> e do Cl<sup>-</sup>, além do déficit hídrico induzido pela alta osmolaridade da solução do solo (MUNNS, 2002). Os efeitos nocivos do Na<sup>+</sup> sobre a nutrição e o metabolismo das plantas são mais conhecidos que aqueles causados pelo Cl<sup>-</sup>. A elevada concentração de Na<sup>+</sup> na solução do solo pode induzir a deficiência de K<sup>+</sup> pela redução da absorção desse nutriente, em decorrência da competição entre esses íons pelos sítios de ligação nos transportadores localizados na membrana plasmática das células epidérmicas e corticais das raízes (MAATHUIS; AMTMANN, 1999; ZHU, 2003). Além disso, a acumulação de Na<sup>+</sup> nos tecidos, principalmente no mesófilo das folhas jovens e maduras, pode acarretar a redução do crescimento associada à inibição das enzimas dependentes do K<sup>+</sup> que atuam na fotossíntese, na respiração e na síntese de proteínas (APSE; BLUMWALD, 2007; MAATHUIS; AMTMANN, 1999).

A toxicidade do Na<sup>+</sup> pode ser mitigada pelas plantas por mecanismos de transporte que devem operar de forma coordenada para lidar com o excesso de Na<sup>+</sup>, incluindo: (1) a absorção pelas raízes; (2) a transferência para a parte aérea via xilema; (3) a recirculação da parte aérea para as raízes via floema; (4) a eliminação para o meio externo pelas raízes; (5) a compartimentalização no vacúolo ou a partição nos órgãos basais ou mais velhos; (6) a secreção pela superfície das folhas (TESTER; DAVENPORT, 2003). As plantas não apresentam transportadores específicos para a absorção de Na<sup>+</sup>, carecendo de mecanismos próprios para reduzir a entrada desse cátion no simplasto radicular (TESTER; DAVENPORT, 2003). Além disso, as plantas possuem habilidade limitada para transferir Na<sup>+</sup> da parte aérea para as raízes pela recirculação via floema (MUNNS; TESTER, 2008). Assim, a eliminação de Na<sup>+</sup> para o meio externo pode ser mais relevante nos ápices radiculares, onde as células não apresentam vacúolos desenvolvidos e dispõem, portanto, de baixa capacidade para a compartimentalização (SHI *et al.*, 2002). Considerando que a eliminação de Na<sup>+</sup> pelas superfícies das folhas requer estruturas adaptativas características das espécies halófitas, a restrição da transferência de Na<sup>+</sup> para a parte

aérea via xilema aliada à compartimentalização desse íon nas raízes consistem nos principais mecanismos para mitigar a toxicidade de Na<sup>+</sup> nas espécies glicófitas (MUNNS; TESTER, 2008).

A transferência de Na<sup>+</sup> para a parte aérea via xilema depende dos mecanismos de carregamento e reabsorção a partir da seiva. Ambos os mecanismos são realizados através dos transportadores localizados na membrana plasmática das células parenquimáticas do xilema (XPCs). O carregamento de Na<sup>+</sup> nos elementos de vaso ainda permanece pouco esclarecido, mas pode envolver os canais retificadores de saída não-seletivos (NORCs) (WEGNER; DEBOER, 1997). Os NORCs detectados em experimentos de eletrofisiologia com protoplastos do estelo de cevada são ativos sob potenciais de membrana positivos e são regulados indiretamente pela concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup> (DEBOER; WEGNER, 1997; WEGNER; RASCHKE, 1994). Estas características apontam para a atuação dos NORCs nos mecanismos para a manutenção do potencial de membrana das XPCs (WEGNER; RASCHKE, 1994) e de sinalização à longa distância, envolvendo a despolarização rápida da membrana e o aumento da pressão osmótica nos elementos de vaso (DEBOER; WEGNER, 1997; WEGNER; DEBOER, 1997). A contribuição dos NORCs para o carregamento de Na<sup>+</sup> no xilema é sugerida pela baixa seletividade desses canais aos cátions monovalentes e pela sua ativação com o aumento da concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup>, fenômeno comum sob condições de estresse, como a salinidade elevada (WEGNER; DEBOER, 1997).

A liberação de Na<sup>+</sup> no xilema também pode envolver o contra-transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> SOS1, pertencente à família NHX (SHI *et al.*, 2002). Esse transportador, identificado em mutantes com elevada sensibilidade ao estresse salino (WU *et al.*, 1996), é expresso na membrana plasmática das células localizadas no cilindro vascular de raízes, caules e folhas em *Arabidopsis thaliana* (SHI *et al.*, 2002). Experimentos utilizando o mutante com perda de função *sos1* sugerem que esse transportador pode promover o carregamento de Na<sup>+</sup> nos elementos de vaso sob salinidade moderada e a reabsorção desse íon da seiva sob salinidade severa. No entanto, as condições termodinâmicas associadas ao transporte de Na<sup>+</sup> na interface XPCs-elementos de vaso são desfavoráveis para a reabsorção desse íon via SOS1 (MUNNS; TESTER, 2008). Assim sendo, SOS1 deve estar primariamente implicado na liberação do Na<sup>+</sup> para a corrente transpiratória.

A diminuição gradativa da concentração de Na<sup>+</sup> na seiva de xilema na direção das folhas mais novas (DURAND; LACAN, 1994; WOLF *et al.*, 1991; YEO *et al.*, 1985) evidencia que

mecanismos para a reabsorção de  $\text{Na}^+$  operam na interface XPCs-elementos de vaso. Experimentos de perfusão em raízes de soja mostram que as XPCs promovem a reabsorção de  $\text{Na}^+$  e a liberação de  $\text{K}^+$  na seiva de xilema sob salinidade moderada (LACAN; DURAND, 1995). Esses mecanismos dependem do gradiente de pH entre o simplasto das XPCs e o apoplasto do estelo, sustentado pela atividade de  $\text{H}^+$ -ATPases, além do potencial de membrana das XPCs, mantido pelo transporte simultâneo de contra-íons, principalmente  $\text{Cl}^-$  (LACAN; DURAND, 1996). A reabsorção de  $\text{Na}^+$  e a liberação de  $\text{K}^+$  na seiva de xilema não apresentam estequiometria definida com a variação das concentrações externas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , mostrando que esses mecanismos são realizados por transportadores independentes (LACAN; DURAND, 1995). De fato, o carregamento de  $\text{K}^+$  nos elementos de vaso deve ser mediado pelos canais retificadores de saída de  $\text{K}^+$  (KORCs), identificados por técnicas de eletrofisiologia em protoplastos do cilindro vascular de cevada (WEGNER; RASCHKE, 1994) e milho (ROBERTS; TESTER, 1995). O canal retificador de saída de  $\text{K}^+$  do estelo (SKOR), clonado a partir das raízes de *A. thaliana*, deve exercer a mesma função nessa espécie (GAYMARD *et al.*, 1998). No entanto, a captação de  $\text{Na}^+$  a partir da corrente transpiratória deve envolver transportadores da família HKT (DAVENPORT *et al.*, 2007; SUNARPI *et al.*, 2005). O HKT1 de *A. thaliana* (MÄSER *et al.*, 2002) e arroz (GOLLDACK *et al.*, 2002) é fortemente expresso no estelo das raízes e nos feixes vasculares das folhas. Além disso, a inativação de HKT1 em *A. thaliana* acarreta o aumento da concentração de  $\text{Na}^+$  na seiva de xilema sob salinidade elevada (SUNARPI *et al.*, 2005) e também reduz a exclusão de  $\text{Na}^+$  da parte aérea (DAVENPORT *et al.*, 2007).

Os mecanismos de compartimentalização de  $\text{Na}^+$  no vacúolo das células radiculares podem contribuir notavelmente para a exclusão de  $\text{Na}^+$  da parte aérea. A microanálise por raios-X das raízes de cevada (PITMAN *et al.*, 1981) e trigo (MUNNS; TESTER, 2008) expostas ao NaCl indica que as células da epiderme e do córtex externo apresentam elevado conteúdo vacuolar de  $\text{Na}^+$ . No entanto, nas raízes de *Phaseolus coccineus* (KRAMER *et al.*, 1977) e videira (STOREY *et al.*, 2003) tratadas com NaCl, a compartimentalização de  $\text{Na}^+$  ocorre principalmente nas células do córtex interno e do estelo. A transferência de  $\text{Na}^+$  do citosol para o vacúolo em arroz (FUKUDA *et al.*, 1999), *A. thaliana* (DARLEY *et al.*, 2000), beterraba (XIA *et al.*, 2002) e milho (ZÖRB *et al.*, 2005) deve ser catalisada pelo contra-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHX1. Em plantas de *A. thaliana* sob tratamento salino, o NHX1 é expresso intensamente nos pêlos radiculares, os quais apresentam vacúolos bastante desenvolvidos (SHI; ZHU, 2002). A compartimentalização

de  $\text{Na}^+$  no vacúolo das células radiculares, especialmente nas camadas celulares mais superficiais, pode contribuir para a exclusão de  $\text{Na}^+$  da corrente transpiratória, restringindo o aporte desse íon no simplasto das XPCs.

De acordo com as evidências apontadas, a resistência ao estresse salino pode estar estreitamente relacionada com a transferência seletiva de  $\text{K}^+$  para a parte aérea via xilema e com a compartimentalização de  $\text{Na}^+$  nas raízes. Estes mecanismos podem atuar de forma coordenada para promover a exclusão de  $\text{Na}^+$  da parte aérea e manter a alta relação  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  nas folhas, evitando distúrbios na homeostase iônica sob estresse salino. Embora o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  via xilema em plantas tratadas com NaCl seja abordado por muitos trabalhos, poucas iniciativas procuram caracterizar a seletividade  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  dos mecanismos que determinam o carregamento desses íons na seiva. No presente trabalho, o efeito da concentração externa de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  sobre o carregamento e o fluxo desses íons no xilema é caracterizado nas plantas de feijão caupi cultivar Pitiúba tratadas com NaCl. Além disso, a seletividade  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  dos mecanismos de transporte que atuam na interface simplasto radicular-xilema é estimada com base na transferência relativa de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  da solução externa para a seiva. Os resultados indicam que feijão caupi apresenta capacidade limitada para excluir  $\text{Na}^+$  do xilema. A transferência seletiva de  $\text{K}^+$  para a parte aérea e a compartimentalização de  $\text{Na}^+$  nas raízes são discutidos como possíveis mecanismos que contribuem para a resistência dessa espécie ao estresse salino.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Material vegetal

Esse trabalho foi desenvolvido com plantas de feijão caupi cultivar Pitiúba oriundas de sementes. As sementes foram germinadas conforme os procedimentos descritos no item 2.2.1. Plântulas de quatro dias em estágio de gancho plumular foram transferidas para vasos plásticos com 0,9 L de solução nutritiva completa (HOAGLAND; ARNON, 1950) contendo  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  625  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  250  $\mu\text{M}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KNO}_3$  500  $\mu\text{M}$ , Fe-EDTA 25  $\mu\text{M}$  e micronutrientes ( $\text{HBO}_3$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2$  2,25  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  0,75  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  1,75  $\mu\text{M}$  e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$

0,025  $\mu\text{M}$ ), pH 6,0. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação por sete dias, repondo-se diariamente o volume transpirado com água destilada deionizada.

### 3.2.2 Tratamentos e coletas

Com o intuito de determinar o efeito da concentração externa de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  sobre o carregamento desses íons na seiva de xilema radicular, foram realizados experimentos utilizando a técnica de exudação radicular (SCHURR, 1998). Os experimentos foram realizados com plantas de onze dias apresentando a primeira folha trifoliolada em expansão. Em todos os experimentos, a aplicação dos tratamentos foi conduzida pela troca da solução nutritiva completa por solução modificada, contendo  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  750  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  250  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  62,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ , Fe-EDTA 25  $\mu\text{M}$  e micronutrientes, pH 6,0. Para testar o efeito do tempo de exposição, as plantas foram tratadas com solução modificada adicionada de KCl 1 mM (controle) ou KCl 1 mM e NaCl 10 mM (tratamento salino) por até três dias, realizando-se coletas diárias. A concentração de  $\text{K}^+$  1 mM foi utilizada por se mostrar suficiente para o desenvolvimento normal das plantas durante o período experimental, enquanto a concentração de  $\text{Na}^+$  10 mM foi escolhida por ser dez vezes maior que a de  $\text{K}^+$  e permitir a exudação da seiva de xilema.

Quando o efeito da concentração externa de  $\text{Na}^+$  foi testado, as plantas foram expostas à solução modificada contendo KCl 1 mM sem NaCl (controle) ou com NaCl 10, 20 e 40 mM (tratamentos salinos) por 24 h. Estas concentrações de  $\text{Na}^+$  foram utilizadas para fornecer proporções  $\text{K}^+:\text{Na}^+$  no meio externo iguais a 1:10, 1:20 e 1:40, nessa ordem. Concentrações externas de  $\text{Na}^+$  mais elevadas não foram testadas porque não permitiram a obtenção da seiva de xilema. Para testar o efeito da concentração externa de  $\text{K}^+$ , as plantas foram mantidas em solução modificada adicionada de KCl 0,1, 1 ou 10 mM, sem NaCl (tratamentos K0,1Na0, K1Na0 e K10Na0, respectivamente) ou com NaCl 10 mM (tratamentos K0,1Na10, K1Na10 e K10Na10, respectivamente), durante 24 h. Assim, as concentrações de  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  escolhidas representavam proporções  $\text{K}^+:\text{Na}^+$  no meio externo equivalentes a 1:100, 1:10 e 1:1 sob tratamentos salinos. Em todos os experimentos, o volume transpirado foi repostado diariamente com água destilada deionizada.

Ao final dos experimentos, a coleta da seiva de xilema foi realizada por exudação radicular (SCHURR, 1998). Para tanto, o caule foi cortado em bixel a 3 cm da raiz. A primeira

gota exudada foi descartada e as seguintes foram coletadas durante 60 min, sendo armazenadas em tubos de microcentrífuga sobre gelo. As amostras foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a determinação das concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Além disso, raízes, folhas velhas (cordiformes) e folhas novas (trifolioladas) também foram coletadas para determinação do conteúdo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ .

### 3.2.3 Determinação de $\text{Na}^+$ e $\text{K}^+$

As determinações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram realizadas pela técnica de fotometria de chama. Assim sendo, as amostras de seiva de xilema foram diluídas de 20 a 40 vezes com água destilada deionizada e lidas em fotômetro de chama (Micronal, modelo B462) calibrado com soluções padrões de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  50 ppm. As amostras secas das raízes, folhas velhas e folhas novas foram pulverizadas com gral e pistilo e mantidas em tubos plásticos fechados à temperatura ambiente até a determinação do conteúdo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Amostras de 50 mg de massa seca pulverizada foram extraídas com 10 mL de água destilada deionizada a  $100^{\circ}\text{C}$  por 60 min em tubos hermeticamente fechados. Após resfriamento, os extratos foram filtrados em algodão e as leituras foram realizadas sob as mesmas calibrações.

### 3.2.4 Determinação do fluxo de seiva, $\text{Na}^+$ e $\text{K}^+$

A massa da seiva e das raízes coletadas foi mensurada em balança analítica e o fluxo de seiva ( $J_V$ ) foi expresso em mg de seiva  $\text{g}^{-1}$  MF de raiz  $\text{h}^{-1}$ . A partir das concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  na seiva e das massas de seiva e raízes coletadas, os fluxos de  $\text{Na}^+$  ( $J_{\text{Na}}$ ) e  $\text{K}^+$  ( $J_{\text{K}}$ ) foram calculados em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF de raiz  $\text{h}^{-1}$  (CABAÑERO; CARVAJAL, 2007).

### 3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos conforme delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Cada repetição consistia em um vaso contendo duas plantas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância seguida de comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Efeito do tempo de exposição ao Na<sup>+</sup>

Nas plantas tratadas com NaCl 10 mM, ocorreu aumento significativo da concentração de Na<sup>+</sup> na seiva de xilema ( $[Na^+]_{xil}$ ) ao longo do tempo de exposição, em relação às plantas controle (Fig. 3.1A). A  $[Na^+]_{xil}$  nas plantas controle variou entre 0,9 e 2,6 mM no decorrer do experimento, enquanto aquela das plantas tratadas variou de 8,7 para 10,7 mM nesse mesmo período. Dessa forma, o tratamento salino aumentou cinco vezes a  $[Na^+]_{xil}$ , comparando as plantas tratadas com as não tratadas após 24 e 48 h do início do experimento. A concentração de K<sup>+</sup> na seiva de xilema ( $[K^+]_{xil}$ ) nas plantas sob tratamento salino também apresentou aumento significativo em referência àquela das plantas controle, mas apenas às 24 e 72 h de exposição (Fig. 3.1B). Nas plantas não tratadas, a  $[K^+]_{xil}$  aumentou de 7,7 para 15,7 mM após 24 h, diminuindo para 8,7 mM ao final de 72 h. Comparativamente, a  $[K^+]_{xil}$  nas plantas tratadas foi de 18,2 mM às 24 h de exposição, decrescendo até 13,8 mM no final do experimento. Assim sendo, o tratamento com NaCl 10 mM aumentou a  $[K^+]_{xil}$  em 15 e 59% nas plantas tratadas às 24 e 72 h, nessa ordem, em relação àquela das respectivas plantas controle. Esses resultados indicaram que o carregamento de K<sup>+</sup> no xilema foi estimulado pelo tratamento salino. Apesar disso, a relação K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> na seiva apresentou redução significativa devido ao tratamento salino ao longo do tempo de exposição, em comparação com o controle (Fig. 3.1C). Enquanto a relação K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> na seiva das plantas não tratadas diminuiu de 8,8 às 0 h para 5,7 às 48 h de tratamento e aumentou para 10,0 ao final do experimento, essa relação diminuiu de 2,0 às 24 h para 1,3 após 72 h em plantas tratadas.

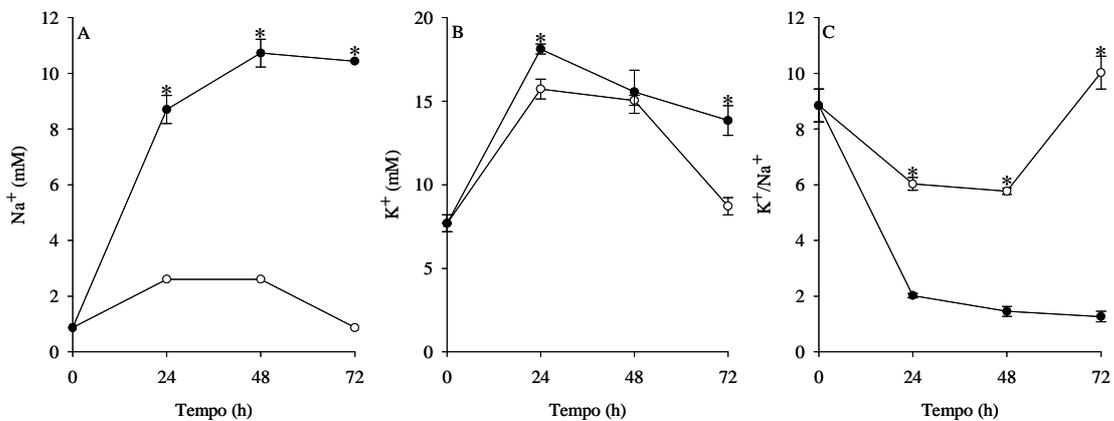


Figura 3.1 – Efeito do tempo de exposição ao Na<sup>+</sup> externo sobre a concentração de Na<sup>+</sup> (A) e K<sup>+</sup> (B) e a relação K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (C) na seiva de xilema em feijão caupi. Plantas de onze dias foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) em casa de vegetação. Em seguida, a solução completa foi trocada por solução modificada (conforme Material e Métodos) contendo KCl 1 mM (controle, círculos brancos) ou KCl 1 mM e NaCl 10 mM (tratamento salino, círculos pretos). As plantas permaneceram por até 72 h em casa de vegetação, realizando-se coletas diárias. Os pontos representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de quatro repetições. Os pontos assinalados com asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo de coleta conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

O fluxo de seiva ( $J_V$ ) aumentou nas plantas controle e tratadas após 24 h, diminuindo progressivamente até as 72 h de tratamento (Fig. 3.2A). Nas plantas não tratadas, o  $J_V$  aumentou de 24,3 para 99,6 mg g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup> das 0 h às 24 h, decrescendo até 28,4 mg g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup> às 72 h. Nas plantas tratadas, o  $J_V$  atingiu apenas 77,2 mg g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup> às 24 h, diminuindo para 13,5 mg g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup> até as 72 h. De acordo com esses resultados, o  $J_V$  foi reduzido significativamente pelo tratamento salino em relação ao controle durante todo o período experimental. De forma semelhante, os fluxos de Na<sup>+</sup> ( $J_{Na}$ ) e de K<sup>+</sup> ( $J_K$ ) aumentaram depois de 24 h nas plantas tratadas e não tratadas, reduzindo ao final de 72 h de tratamento (Fig. 3.2B e C, respectivamente). Nas plantas controle, o  $J_{Na}$  aumentou de 0,02 para 0,26 μmol g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup> das 0 h para as 24 h, decrescendo para 0,02 μmol g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup> novamente ao final do experimento (Fig. 3.2B). Em contraste, o  $J_{Na}$  foi equivalente a 0,70 μmol g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup> às 24 h nas plantas tratadas, reduzindo para 0,14 μmol g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup> após 72 h. Assim, o tratamento com NaCl 10 mM ocasionou aumento significativo do  $J_{Na}$  em relação ao controle. Apesar disso, esse tratamento não causou modificação significativa do  $J_K$  em comparação com o controle no decorrer do experimento (Fig. 3.2C).

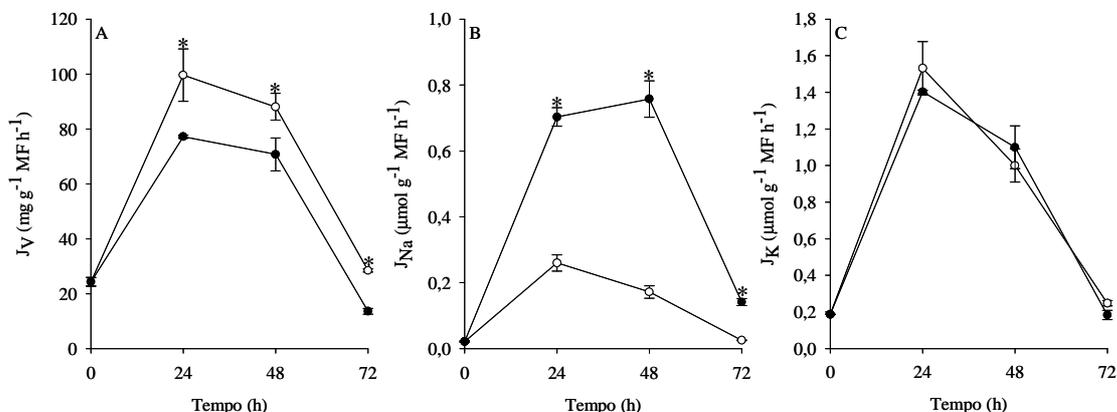


Figura 3.2 – Efeito do tempo de exposição ao Na<sup>+</sup> externo sobre o fluxo de seiva (A) e o fluxo de Na<sup>+</sup> (B) e K<sup>+</sup> (C) no xilema em feijão caupi. Plantas de onze dias foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) em casa de vegetação. Em seguida, a solução completa foi trocada por solução modificada (conforme Material e Métodos) contendo KCl 1 mM (controle, círculos brancos) ou KCl 1 mM e NaCl 10 mM (tratamento salino, círculos pretos). As plantas permaneceram por até 72 h em casa de vegetação, realizando-se coletas diárias. Os pontos representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de quatro repetições. Os pontos assinalados com asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo de coleta conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Nas plantas tratadas com NaCl 10 mM, o conteúdo de Na<sup>+</sup> nas raízes, folhas velhas e folhas novas sofreu aumento significativo e progressivo ao longo do experimento, em comparação com as plantas não tratadas (Tabela 3.1). Porém, as raízes acumularam cerca de dez vezes mais Na<sup>+</sup> que as folhas velhas e as folhas novas nas plantas tratadas, durante todo o período experimental.

Tabela 3.1 – Efeito do tempo de exposição ao Na<sup>+</sup> externo sobre o conteúdo de Na<sup>+</sup> (μmol g<sup>-1</sup> MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna para o mesmo tempo de exposição diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tempo (h)	Tratamento (mM)	Parte da planta		
		Raiz	Folha velha	Folha nova
0	NaCl 0	318,84	95,65	82,61
24	NaCl 0	347,83b	95,65b	86,96b
	NaCl 10	927,53a	121,74a	115,94a
48	NaCl 0	304,35b	98,55b	84,06b
	NaCl 10	1202,89a	130,43a	127,53a
72	NaCl 0	318,84b	107,24b	104,34b
	NaCl 10	1681,16a	143,48a	147,82a

O tratamento salino causou redução significativa no conteúdo de  $K^+$  das raízes ao longo do tempo, em comparação com o controle (Tabela 3.2). Inversamente, as plantas tratadas demonstraram aumento significativo no conteúdo de  $K^+$  nas folhas velhas após 72 h de tratamento e naquele nas folhas novas às 48 e 72 h de exposição, em referência às plantas controle.

Tabela 3.2 – Efeito do tempo de exposição ao  $Na^+$  externo sobre o conteúdo de  $K^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna para o mesmo tempo de exposição diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tempo (h)	Tratamento (mM)	Parte da planta		
		Raiz	Folha velha	Folha nova
0	NaCl 0	965,81	948,72	641,02
24	NaCl 0	1324,78a	1076,92a	880,34a
	NaCl 10	1145,30b	1145,30a	931,62a
48	NaCl 0	1192,31a	1059,82a	871,79b
	NaCl 10	884,61b	1136,75a	940,17a
72	NaCl 0	1170,94a	1128,20b	837,60b
	NaCl 10	820,51b	1256,41a	965,81a

A relação  $K^+/Na^+$  foi significativamente reduzida nas raízes, folhas velhas e folhas novas pelo tratamento salino no decorrer do experimento, em comparação com o controle (Tabela 3.3). Além disso, a raiz apresentou redução mais pronunciada da relação  $K^+/Na^+$  que as folhas velhas e as folhas novas, comparando as plantas tratadas com as controle.

Tabela 3.3 – Efeito do tempo de exposição ao  $Na^+$  externo sobre a relação  $K^+/Na^+$  nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna para o mesmo tempo de exposição diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tempo (h)	Tratamento (mM)	Parte da planta		
		Raiz	Folha velha	Folha nova
0	NaCl 0	3,03	9,96	7,77
24	NaCl 0	3,80a	11,25a	10,12a
	NaCl 10	1,23b	9,41b	8,04b
48	NaCl 0	3,92a	10,78a	10,40a
	NaCl 10	0,73b	8,73b	7,38b
72	NaCl 0	3,69a	10,53a	8,05a
	NaCl 10	0,48b	8,76b	6,55b

A partir desses resultados, o tempo de exposição de 24 h foi escolhido para a realização dos demais experimentos. Esse período foi prolongado o suficiente para acusar contrastes entre os tratamentos, mas foi curto o bastante para não afetar demasiadamente as proporções estabelecidas inicialmente entre  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  na solução externa (dados não mostrados).

### 3.3.2 Efeito da concentração externa de $\text{Na}^+$

O aumento da concentração externa de  $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ ) causou incremento significativo da  $[\text{Na}^+]_{\text{xil}}$  (Fig. 3.3A) e da  $[\text{K}^+]_{\text{xil}}$  (Fig. 3.3B) nas plantas tratadas, em comparação com as plantas controle. A  $[\text{Na}^+]_{\text{xil}}$  nas plantas não tratadas foi equivalente a 0,8 mM, enquanto aquela das plantas tratadas com NaCl 10, 20 e 40 mM atingiu 6,7, 18,3 e 32,2 mM, representando um aumento de 8, 21 e 37 vezes em relação às plantas não tratadas, respectivamente. Além disso, a  $[\text{K}^+]_{\text{xil}}$  nas plantas controle foi igual a 12,3 mM e, nas plantas tratadas com NaCl 10, 20 e 40 mM, alcançou aproximadamente 17,0 mM, consistindo em um aumento de 45% em referência ao controle. Novamente, os tratamentos salinos induziram o carregamento de  $\text{K}^+$  no xilema. Ainda, a relação  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  na seiva de xilema apresentou redução significativa e progressiva com o aumento da salinidade externa, reduzindo de 14,1 nas plantas não tratadas para 2,9, 0,9 e 0,5 nas plantas tratadas com NaCl 10, 20 e 40 mM, nessa ordem (Fig. 3.3C).

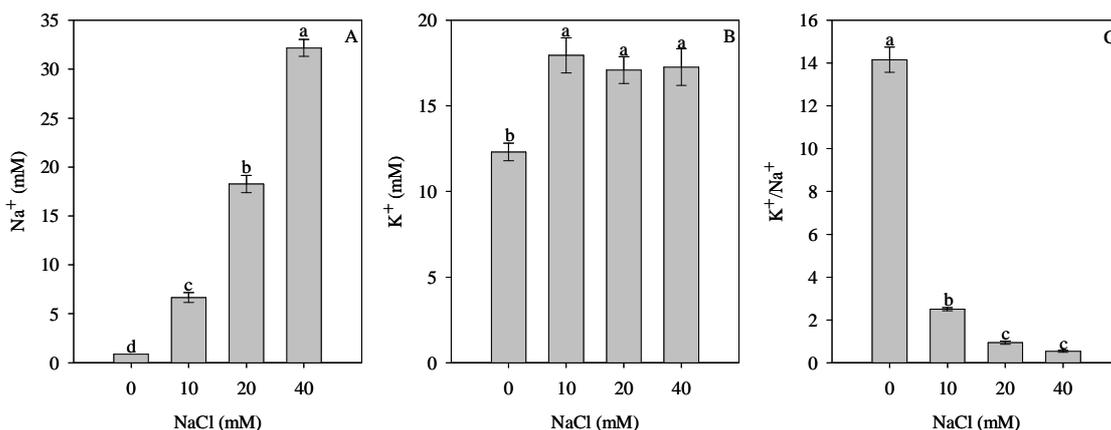


Figura 3.3 – Efeito da concentração externa de  $\text{Na}^+$  sobre a concentração de  $\text{Na}^+$  (A) e  $\text{K}^+$  (B) e a relação  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (C) na seiva de xilema em feijão caupi. Plantas de onze dias foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) em casa de vegetação. Em seguida, a solução completa foi trocada por solução modificada (conforme Material e Métodos) contendo KCl 1 mM sem NaCl (controle) ou com NaCl 10, 20 e 40 mM (tratamentos salinos). As plantas permaneceram por 24 h em casa de vegetação. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de quatro repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Concentrações externas crescentes de  $\text{Na}^+$  na solução externa ocasionaram a redução significativa do  $J_V$  (Fig. 3.4A) e do  $J_K$  (Fig. 3.4C), mas causaram aumento progressivo do  $J_{\text{Na}}$  (Fig. 3.4B), comparando as plantas tratadas com as não tratadas. Nas plantas controle, o  $J_V$  correspondia a  $110,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$  e, nas plantas expostas ao NaCl 10, 20 e 40 mM, foi reduzido para 85,9, 70,9 e  $34,0 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$ , nessa ordem (Fig. 3.4A). Inversamente, o  $J_{\text{Na}}$  equivalia a  $0,10 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$  nas plantas não tratadas, aumentando para 0,61, 1,13 e  $1,21 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$  nas plantas tratadas com NaCl 10, 20 e 40 mM, respectivamente (Fig. 3.4B). Nas plantas controle, o  $J_K$  foi igual a  $1,45 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$ , diminuindo para 1,12 e  $0,64 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$  nas plantas tratadas com NaCl 20 e 40 mM, nessa ordem (Fig. 3.4C).

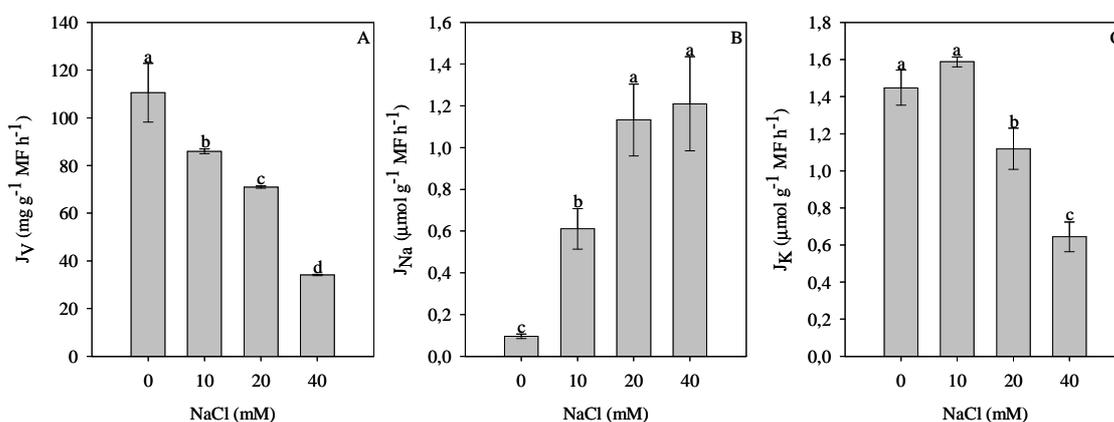


Figura 3.4 – Efeito da concentração externa de  $\text{Na}^+$  sobre o fluxo de seiva (A) e o fluxo de  $\text{Na}^+$  (B) e  $\text{K}^+$  (C) no xilema em feijão caupi. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de quatro repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

O incremento da  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  por apenas 24 h acarretou o acréscimo significativo do conteúdo de  $\text{Na}^+$  nas raízes, folhas velhas e folhas novas, comparando as plantas tratadas com as controle (Tabela 3.4). No entanto, o conteúdo de  $\text{Na}^+$  nas raízes foi cerca de cinco vezes maior que o das folhas velhas e folhas novas nas plantas expostas ao NaCl 40 mM.

Tabela 3.4 – Efeito da concentração externa de  $\text{Na}^+$  sobre o conteúdo de  $\text{Na}^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MS}$ ) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tratamento (mM)	Parte da planta		
	Raiz	Folha velha	Folha nova
NaCl 0	253,62d	126,08c	89,85c
NaCl 10	724,63c	133,33c	101,45c
NaCl 20	985,50b	156,52b	126,08b
NaCl 40	1130,43a	208,69a	213,04a

O conteúdo de  $K^+$  nas raízes e folhas velhas foi reduzido significativamente com o aumento da  $[Na^+]_{ext}$ , confrontando as plantas tratadas com as controle (Tabela 3.5). No entanto, as raízes apresentaram redução de até 15% no conteúdo de  $K^+$ , enquanto as folhas velhas demonstraram diminuição inferior a 7%, comparando as plantas tratadas com NaCl 40 mM e as plantas não tratadas. Além disso, o conteúdo de  $K^+$  nas folhas novas não apresentou diminuição significativa nas plantas tratadas com relação às não tratadas.

Tabela 3.5 – Efeito da concentração externa de  $Na^+$  sobre o conteúdo de  $K^+$  ( $\mu mol g^{-1} MS$ ) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tratamento (mM)	Parte da planta		
	Raiz	Folha velha	Folha nova
NaCl 0	1145,30a	1145,30ab	820,51b
NaCl 10	1025,64b	1179,49a	880,34a
NaCl 20	1008,54b	1128,20ab	820,51b
NaCl 40	974,36b	1068,37b	803,41b

A relação  $K^+/Na^+$  apresentou decréscimo significativo e progressivo nas raízes, folhas velhas e folhas novas de acordo com o incremento da  $[Na^+]_{ext}$  (Tabela 3.6). Porém, a relação  $K^+/Na^+$  diminuiu até 80% nas raízes e apenas 44 e 58% nas folhas velhas e folhas novas, respectivamente, comparando as plantas expostas ao NaCl 40 mM com as não expostas.

Tabela 3.6 – Efeito da concentração externa de  $Na^+$  sobre a relação  $K^+/Na^+$  nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tratamento (mM)	Parte da planta		
	Raiz	Folha velha	Folha nova
NaCl 0	4,52a	9,09a	9,15a
NaCl 10	1,41b	8,85a	8,68a
NaCl 20	1,03bc	7,22b	6,54b
NaCl 40	0,86c	5,12c	3,78c

### 3.3.3 Efeito da concentração externa de $K^+$

O aumento da concentração externa de  $K^+$  ( $[K^+]_{ext}$ ) causou incremento significativo da  $[Na^+]_{xil}$  (Fig. 3.5A) e da  $[K^+]_{xil}$  (Fig. 3.5B), tanto nas plantas controle quanto nas plantas tratadas com NaCl 10 mM. Nas plantas controle mantidas em KCl 0,1, 1 e 10 mM, a  $[Na^+]_{xil}$  foi equivalente a 0,8, 1,7 e 4,0 mM, nessa ordem, e nas plantas tratadas com NaCl 10 mM, foi de 4,6, 6,3 e 8,2, respectivamente (Fig. 3.5A). Em comparação, a  $[K^+]_{xil}$  nas plantas controle expostas ao

KCl 0,1, 1 e 10 mM correspondeu a 6,6, 12,3 e 29,7 mM, nessa ordem, enquanto aquela medida nas plantas tratadas foi de 11,1, 17,9 e 32,4 mM, respectivamente (Fig. 3.5B). De acordo com esses resultados, o aumento da  $[Na^+]_{ext}$ , na presença de KCl 0,1 ou 1 mM, estimulou o carregamento de  $K^+$  no xilema, mas esse efeito não foi verificado na presença de KCl 10 mM. O incremento da  $[K^+]_{ext}$  também estimulou a liberação de  $Na^+$  no xilema. Ainda, o tratamento salino causou decréscimo significativo na relação  $K^+/Na^+$  da seiva de xilema (Fig. 3.5C), confrontando as plantas tratadas com as controle. No entanto, as plantas mantidas em KCl 0,1 e 1 mM apresentaram redução de aproximadamente 64% na relação  $K^+/Na^+$  da seiva, enquanto as expostas a KCl 10 mM mostraram somente 45% de redução nessa relação, quando as plantas tratadas foram comparadas com as respectivas plantas controle.

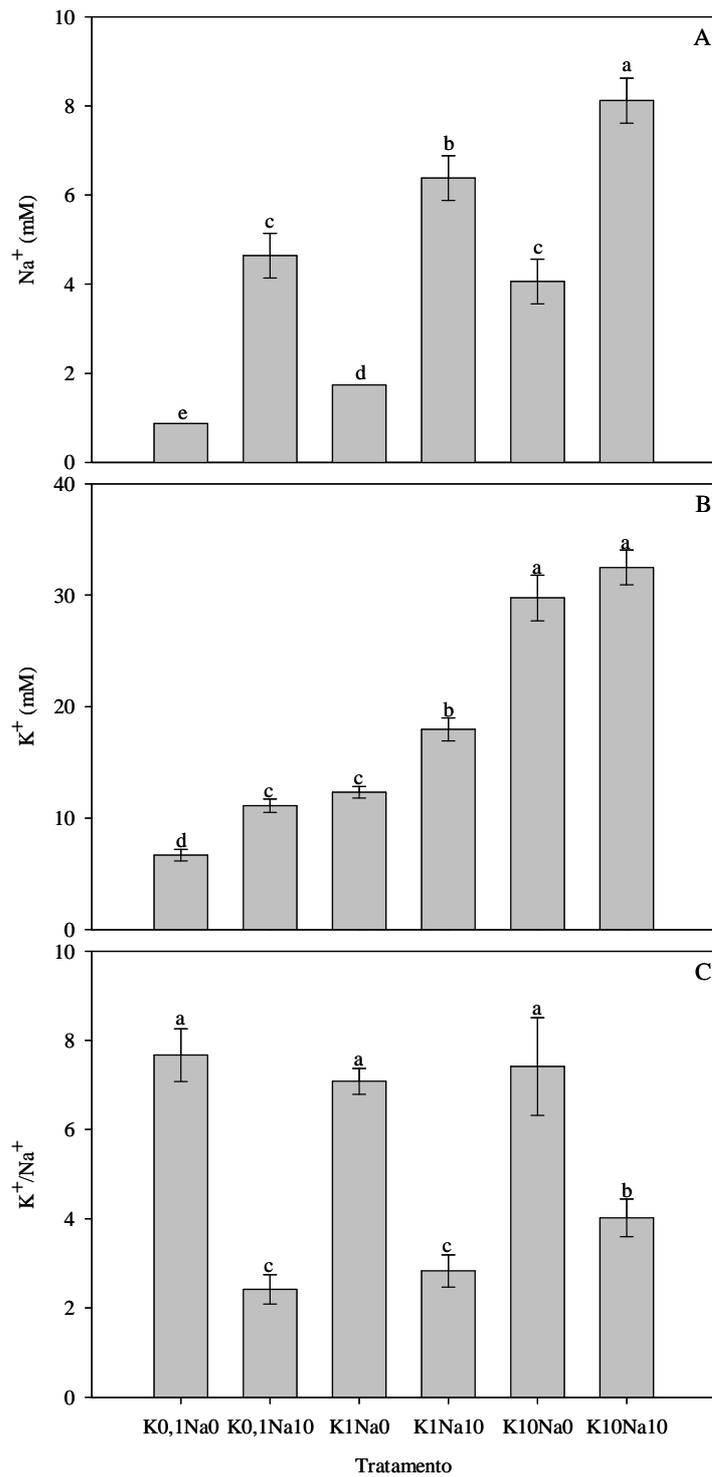


Figura 3.5 – Efeito da concentração externa de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> sobre a concentração de Na<sup>+</sup> (A) e K<sup>+</sup> (B) e a relação K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (C) na seiva de xilema em feijão caupi. Plantas de onze dias foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) em casa de vegetação. Em seguida, a solução completa foi trocada por solução modificada (conforme Material e Métodos) contendo KCl 0,1, 1 ou 10 mM sem NaCl (tratamentos K0,1Na0, K1Na0 e K10Na0, respectivamente) ou com NaCl 10 mM (tratamentos K0,1Na10, K1Na10 e K10Na10, respectivamente). As plantas permaneceram por 24 h em casa de vegetação. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de quatro repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

A exposição das plantas a concentrações externas crescentes de  $K^+$  e  $Na^+$  ocasionou a redução significativa do  $J_V$  (Fig. 3.6A), mas houve acréscimo significativo do  $J_{Na}$  (Fig. 3.6B) e do  $J_K$  (Fig. 3.6C). As plantas controle mantidas em KCl 0,1, 1 e 10 mM apresentaram  $J_V$  equivalente a 100,3, 85,8 e 62,1  $mg\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ , nessa ordem, mas as plantas tratadas com NaCl 10 mM demonstraram valores menores, iguais a 78,2, 80,0 e 46,1  $mg\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ , respectivamente (Fig. 3.6A). Nas plantas não tratadas com NaCl e expostas ao KCl 0,1, 1 e 10 mM, o  $J_{Na}$  foi equivalente a 0,09, 0,16 e 0,26  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ , nessa ordem, mas aumentou para 0,37, 0,42 e 0,38  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ , nas respectivas plantas sob tratamento salino (Fig. 3.6B). Além disso, o  $J_K$  foi igual a 0,64, 1,08 e 2,01  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$  nas plantas controle mantidas em KCl 0,1, 1 e 10 mM, respectivamente, e foi equivalente a 0,79, 1,40 e 1,49  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$  nas respectivas plantas tratadas com NaCl 10 mM (Fig. 3.6C). Desse modo, o  $J_{Na}$  não foi modificado com o incremento da  $[K^+]_{ext}$ , mas o  $J_K$  foi reduzido por NaCl 10 mM na presença de KCl 10 mM.

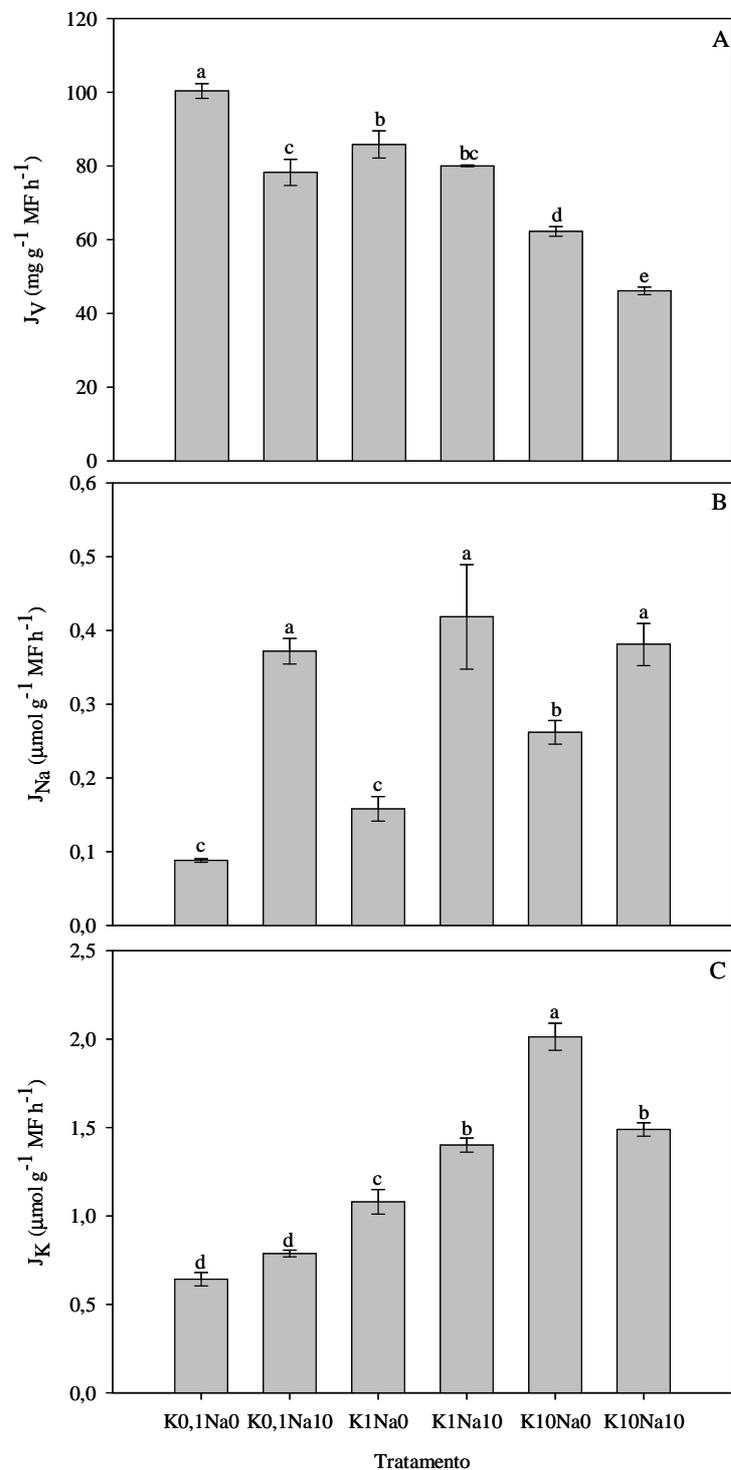


Figura 3.6 – Efeito da concentração externa de  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  sobre o fluxo de seiva (A) e o fluxo de  $\text{Na}^+$  (B) e  $\text{K}^+$  (C) no xilema em feijão caupi. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de quatro repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

O conteúdo de  $\text{Na}^+$  nas raízes das plantas sob tratamento salino foi aumentado significativamente em referência ao das plantas não tratadas (Tabela 3.7). No entanto, o incremento da  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  amenizou esse aumento no conteúdo de  $\text{Na}^+$ . Explicitamente, o conteúdo de  $\text{Na}^+$  nas raízes aumentou 3,8, 2,7 e 1,7 vezes nas plantas tratadas com NaCl 10 mM e mantidas em KCl 0,1, 1 e 10 mM, nessa ordem, em relação às respectivas plantas não tratadas. Apesar disso, a exposição ao tratamento salino não acarretou alterações significativas no conteúdo de  $\text{Na}^+$  das folhas velhas, comparando as plantas tratadas com as respectivas plantas controle. O tratamento com NaCl 10 mM ocasionou aumento significativo no conteúdo de  $\text{Na}^+$  das folhas novas apenas em plantas mantidas em KCl 0,1 mM, confrontando o tratamento salino com o respectivo controle.

Tabela 3.7 – Efeito da concentração externa de  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  sobre o conteúdo de  $\text{Na}^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tratamento (mM)	Parte da planta		
	Raiz	Folha velha	Folha nova
K0,1Na0	239,13e	118,84ab	72,46c
K0,1Na10	913,04a	107,24b	95,65b
K1Na0	289,85de	117,39ab	100,00ab
K1Na10	782,61b	134,78a	92,75b
K10Na0	347,83d	117,39ab	111,59a
K10Na10	608,69c	113,04ab	113,04a

Concentrações externas crescentes de  $\text{K}^+$  causaram incremento significativo e progressivo no conteúdo de  $\text{K}^+$  nas raízes, folhas velhas e folhas novas (Tabela 3.8). Esse incremento foi significativamente amenizado pelo tratamento salino apenas nas folhas velhas de plantas mantidas em KCl 1 mM, comparando as plantas tratadas com as respectivas plantas não tratadas.

Tabela 3.8 – Efeito da concentração externa de  $K^+$  e  $Na^+$  sobre o conteúdo de  $K^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tratamento (mM)	Parte da planta		
	Raiz	Folha velha	Folha nova
K0,1Na0	820,51d	974,36c	641,02d
K0,1Na10	717,95d	982,90c	641,03d
K1Na0	1170,94b	1076,92bc	871,19bc
K1Na10	1051,28c	1153,84ab	863,24c
K10Na0	1641,02a	1256,41a	1051,28a
K10Na10	1658,12a	1188,03ab	1042,73ab

O tratamento com NaCl 10 mM acarretou a redução significativa da relação  $K^+/Na^+$  na raiz e essa redução foi tanto maior quanto menor foi a  $[K^+]_{\text{ext}}$  (Tabela 3.9). Especificamente, a relação  $K^+/Na^+$  das raízes foi diminuída 78, 65 e 42% nas plantas tratadas com NaCl 10 mM e expostas a KCl 0,1, 1 e 10 mM, nessa ordem, em comparação com as respectivas plantas controle. Além disso, o tratamento salino não ocasionou alterações significativas na relação  $K^+/Na^+$  nas folhas velhas, comparando as plantas tratadas e as controle, causando a redução significativa dessa relação apenas nas folhas novas das plantas mantidas em KCl 0,1 mM.

Tabela 3.9 – Efeito da concentração externa de  $K^+$  e  $Na^+$  sobre a relação  $K^+/Na^+$  nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tratamento (mM)	Parte da planta		
	Raiz	Folha velha	Folha nova
K0,1Na0	3,65c	8,20c	8,86a
K0,1Na10	0,79f	9,15bc	6,73b
K1Na0	3,92b	9,18abc	8,72a
K1Na10	1,34e	9,70abc	9,31a
K10Na0	4,72a	10,70a	9,44a
K10Na10	2,73d	10,51ab	9,22a

### 3.4 DISCUSSÃO

#### 3.4.1 As plantas de feijão caupi apresentam capacidade limitada para excluir $\text{Na}^+$ da seiva de xilema

A concentração de  $\text{Na}^+$  na seiva de xilema das plantas de feijão caupi tratadas com NaCl representa de 65 a 80% da concentração externa desse íon na maioria dos tratamentos. A relação  $([\text{Na}^+]_{\text{ext}} - [\text{Na}^+]_{\text{xil}}) / [\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  (%) tem sido utilizada como estimativa da capacidade apresentada pelas plantas para excluir  $\text{Na}^+$  da seiva em relação ao meio externo (MUNNS, 2002). Dessa forma, as plantas de feijão caupi cultivar Pitiúba são capazes de excluir apenas 20 a 35% do  $\text{Na}^+$  presente na solução externa após 24 h de tratamento. Outras dicotiledôneas também apresentam habilidade limitada para restringir o acesso do  $\text{Na}^+$  ao xilema. Nas plantas de *L. albus* tratadas com NaCl 40 mM por 15 dias (JESCHKE *et al.*, 1986) e nas plantas de soja mantidas sob NaCl 25 mM por 6 dias (DURAND; LACAN 1994), a  $[\text{Na}^+]_{\text{xil}}$  alcança 75 e 35% da  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ , correspondendo a 25 e 65% de exclusão, respectivamente. As plantas de pimenta tratadas com NaCl 15 mM por duas semanas apresentam a  $[\text{Na}^+]_{\text{xil}}$  superior à  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  na base do caule, indicando o acesso irrestrito do  $\text{Na}^+$  através da interface simplasto radicular-xilema (BLOM-ZANDSTRA *et al.*, 1998). Em contraponto, as plantas de *A. thaliana* expostas a NaCl 100 mM por 2 dias conseguem excluir até 90% do  $\text{Na}^+$  presente no meio externo (SHI *et al.*, 2002). As monocotiledôneas, por sua vez, demonstram maior habilidade para restringir o acesso do  $\text{Na}^+$  ao xilema. Nas plantas de cevada mantidas em NaCl 100 mM por três semanas (WOLF *et al.*, 1991) e nas plantas de trigo submetidas a NaCl 150 mM por 8 dias (WATSON *et al.*, 2001), a exclusão do  $\text{Na}^+$  da seiva em relação ao meio externo supera 90%. As plantas de arroz tratadas com NaCl 50 mM por 4 dias demonstram uma  $[\text{Na}^+]_{\text{xil}}$  equivalente a somente 25% da  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ , evidenciando 75% de exclusão (YEO *et al.*, 1985). Considerando que as plantas de feijão caupi cultivar Pitiúba apresentam acesso quase irrestrito do  $\text{Na}^+$  à seiva, outros mecanismos de transporte na interface simplasto radicular-xilema podem contribuir para evitar distúrbios na homeostase iônica dessa espécie sob estresse salino.

#### 3.4.2 O carregamento do $\text{K}^+$ no xilema é estimulado pelo $\text{Na}^+$ , assim como a liberação do $\text{Na}^+$ no xilema é promovida pelo $\text{K}^+$

Nas plantas de feijão caupi, o incremento da  $[Na^+]_{ext}$  aumenta a  $[K^+]_{xil}$  em 45 %, indicando a estimulação do carregamento do  $K^+$  pelo  $Na^+$ . O estresse salino apresenta efeito similar em outras dicotiledôneas. A exposição das plantas de *L. albus* ao NaCl 40 mM por 15 dias (JESCHKE *et al.*, 1986) e das plantas de soja ao NaCl 25 mM por 6 dias (DURAND; LACAN 1994) acarreta aproximadamente 50% de acréscimo na  $[K^+]_{xil}$ . Nas plantas de feijão comum mantidas em NaCl 75 mM por 4 dias durante o verão, a  $[K^+]_{xil}$  apresenta incremento de cerca de 40% (CABOT *et al.*, 2005). No entanto, as plantas de cevada tratadas com NaCl 100 mM por 3 dias (MUNNS, 1985) e as plantas de trigo expostas ao NaCl 150 mM por 2 dias (WATSON *et al.*, 2001) apresentam diminuição da  $[K^+]_{xil}$  em mais de 30%. Essas evidências mostram que as dicotiledôneas apresentam mecanismos de transporte na interface simplasto radicular-xilema que aumentam o aporte do  $K^+$  na seiva sob estresse salino. Inversamente, o aumento da  $[Na^+]_{ext}$  restringe o acesso do  $K^+$  ao xilema nas monocotiledôneas.

Considerando que as dicotiledôneas apresentam habilidade limitada para excluir o  $Na^+$  da seiva, é possível que o aumento da  $[Na^+]_{xil}$  atue como sinal para incrementar o carregamento do  $K^+$ . Esse mecanismo poderia compensar o aumento da  $[Na^+]_{xil}$  pelo incremento da  $[K^+]_{xil}$ , conservando uma alta relação  $K^+/Na^+$  na seiva. Como conseqüência, a transferência do  $K^+$  para a parte aérea continuaria sendo maior que a do  $Na^+$  mesmo sob estresse salino, evitando a toxicidade de  $Na^+$  nas folhas pela manutenção da elevada relação  $K^+/Na^+$  nos tecidos fotossintetizantes. Realmente, nas plantas de feijão caupi e de soja (DURAND; LACAN 1994) tratadas com NaCl, a relação  $K^+/Na^+$  na seiva é conservada acima de 1, enquanto aquela na seiva de cevada (MUNNS, 1985) e trigo (WATSON *et al.*, 2001) é inferior a esse valor. Assim, embora as monocotiledôneas sejam mais hábeis para excluir o  $Na^+$  da seiva de xilema, as dicotiledôneas conseguem garantir maior transferência do  $K^+$  para a parte aérea em relação ao  $Na^+$  sob estresse salino.

O incremento progressivo da  $[K^+]_{ext}$  também acarreta o aumento da  $[Na^+]_{xil}$  nas plantas de feijão caupi, sugerindo que o carregamento do  $Na^+$  é promovido pelo  $K^+$ . Poucos trabalhos abordam o efeito da  $[K^+]_{ext}$  sobre a  $[Na^+]_{xil}$ , mas os resultados encontrados para as raízes de soja em experimentos de perfusão são opostos aos obtidos para as plantas de feijão caupi. Nas raízes de soja, o aumento da  $[K^+]_{ext}$  ocasiona a diminuição da  $[Na^+]_{xil}$ , mesmo quando a concentração de  $Na^+$  na solução de perfusão equivale ao dobro da  $[K^+]_{ext}$ . Essas evidências mostram que as plantas de soja apresentam mecanismos para a reabsorção do  $Na^+$  a partir da seiva, restringindo a

transferência desse íon para a parte aérea (LACAN; DURAND, 1995). A ocorrência de um mecanismo similar em feijão caupi não pode ser descartada, pois os mecanismos para a reabsorção do  $\text{Na}^+$  a partir da seiva podem atuar mais intensamente nas regiões localizadas acima da base do caule (BLOM-ZANDSTRA *et al.*, 1998; DURAND; LACAN 1994).

### 3.4.3 Os mecanismos de carregamento do xilema em feijão caupi apresentam elevada seletividade $\text{K}^+/\text{Na}^+$

A relação  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  na seiva de xilema nas plantas de feijão caupi se mantém acima de 2 em quase todos os tratamentos salinos, indicando o transporte seletivo do  $\text{K}^+$  em relação ao  $\text{Na}^+$ . Essa relação se aproxima de 1 quando as plantas são tratadas com KCl 1 mM e NaCl 20 mM e alcança valor inferior a 1 sob KCl 1 mM e NaCl 40 mM. A concentração de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  na seiva é o resultado dos mecanismos de transporte que efetuam o carregamento e a reabsorção desses íons na interface simplasto radicular-xilema (LACAN; DURAND, 1995). Desse modo, os resultados mencionados sugerem que a  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  equivalente a 20 mM, na presença da  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  igual a 1 mM, pode representar um limiar a partir do qual os mecanismos de transporte que operam nas XPCs nas plantas de feijão caupi não conseguem manter o maior aporte do  $\text{K}^+$  em relação ao  $\text{Na}^+$  na seiva. Mesmo assim, a  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  precisa ser 20 vezes maior que a  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  para colapsar o transporte seletivo de  $\text{K}^+$ . Nas plantas de *L. albus* (JESCHKE *et al.*, 1986) e soja (DURAND; LACAN 1994), a relação  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  na seiva de xilema também se torna inferior a 1 somente quando a  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  é 18 vezes maior que a  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ .

A relação  $[\text{Na}^+]_{\text{xil}}/[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  tem sido empregada para estimar a transferência relativa de  $\text{Na}^+$  do meio externo para a seiva de xilema (GARCIA *et al.*, 1997). Utilizando as relações  $[\text{K}^+]_{\text{xil}}/[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  e  $[\text{Na}^+]_{\text{xil}}/[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  nas plantas de feijão caupi tratadas com KCl 1 mM e NaCl 10 mM durante 24 h, os valores 18 e 0,7 são obtidos, respectivamente. Esses valores podem indicar que as plantas de feijão caupi sob essas condições são capazes de concentrar o  $\text{K}^+$  18 vezes na seiva e excluir 30% do  $\text{Na}^+$  em relação ao meio externo. Se a relação  $([\text{K}^+]_{\text{xil}}/[\text{K}^+]_{\text{ext}})/([\text{Na}^+]_{\text{xil}}/[\text{Na}^+]_{\text{ext}})$  for tomada como uma estimativa da capacidade apresentada pelo sistema radicular para discriminar o  $\text{K}^+$  do  $\text{Na}^+$ , o valor 25 é encontrado. Com base nessas observações, é possível sugerir que os mecanismos de transporte associados às XPCs em feijão caupi apresentam elevada seletividade  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ . Corroborando com essa sugestão, a relação

$K^+/Na^+$  na seiva é mantida em 2,9 no tratamento mencionado, mesmo que a  $[Na^+]_{ext}$  seja 10 vezes maior que a  $[K^+]_{ext}$ . Utilizando a relação  $([K^+]_{xil}/[K^+]_{ext})/([Na^+]_{xil}/[Na^+]_{ext})$  para estimar a seletividade  $K^+/Na^+$  nas plantas de *L. albus* (JESCHKE *et al.*, 1986) e soja (DURAND; LACAN 1994) tratadas com NaCl, valores elevados como 13 e 9, respectivamente, são obtidos.

#### 3.4.4 Mecanismos de transporte potencialmente envolvidos no carregamento de $Na^+$ na seiva de xilema

Os resultados desse trabalho são insuficientes para determinar quais transportadores localizados na membrana plasmática das XPCs medeiam o carregamento de  $Na^+$  na seiva de xilema nas plantas de feijão caupi. No entanto, alguns resultados podem sugerir a participação dos mecanismos de transporte descritos previamente para outras espécies. Várias evidências experimentais indicam que os NORCs (WEGNER; DEBOER, 1997) e o contra-transportador  $Na^+/H^+$  SOS1 (SHI *et al.*, 2002) estão envolvidos com o carregamento de  $Na^+$  nos elementos de vaso. Os NORCs são ativados com o aumento da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  (DEBOER; WEGNER, 1997; WEGNER; RASCHKE, 1994), fenômeno que pode estar associado às vias de sinalização sob estresse salino (WEGNER; DEBOER, 1997). Dessa forma, se o carregamento de  $Na^+$  no xilema em feijão caupi for mediado pelos NORCs, o aumento da  $[K^+]_{xil}$  induzido pelo incremento da  $[Na^+]_{ext}$  pode estar relacionado com a atividade desses canais. Os NORCs apresentam baixa seletividade pelos cátions monovalentes, podendo causar a liberação tanto do  $Na^+$  quanto do  $K^+$  na seiva (WEGNER; DEBOER, 1997). Além disso, se o carregamento de  $Na^+$  no xilema em feijão caupi também depender da atividade de SOS1, o contra-transporte  $Na^+/H^+$  na membrana plasmática das XPCs poderia ocasionar a acidificação momentânea do citosol nessas células. Nos ovócitos de *Xenopus leavis* expressando SKOR de *A. thaliana*, a diminuição do pH citosólico de 7,4 para 7,2 ocasiona a inibição desse canal, o qual está envolvido com o carregamento de  $K^+$  no xilema dessa espécie (LACOMBE *et al.*, 2000). Como ocorre o aumento concomitante da  $[Na^+]_{xil}$  e da  $[K^+]_{xil}$  sob tratamentos salinos em feijão caupi, a participação de SOS1 na liberação do  $Na^+$  para a seiva parece pouco provável, porque a atividade desse transportador inibiria os canais que medeiam o carregamento de  $K^+$ , evitando o aumento da  $[K^+]_{xil}$  na presença do NaCl.

### 3.4.5 A redução do fluxo de seiva é um efeito primário do déficit hídrico induzido pelo tratamento salino

Como esperado, o aumento da concentração externa de NaCl e KCl causa a diminuição do fluxo de seiva ( $J_V$ ) em plantas de feijão caupi. De fato, tratamentos com NaCl acima de 40 mM dificultam a obtenção da seiva de xilema por exsudação radicular (resultados não mostrados), assim como o tratamento com KCl 10 mM reduz o  $J_V$  em 27% em referência àquele com KCl 1 mM. Esses resultados indicam claramente o efeito osmótico decorrente da alta concentração externa de sais solúveis. O déficit hídrico induzido pela diminuição do potencial osmótico na solução externa é o primeiro efeito causado pelo estresse salino sobre as plantas (MUNNS, 2002). Tratamentos salinos de curta duração também inibem fortemente o  $J_V$  nas plantas de *A. thaliana* (MARTÍNEZ-BALLESTA *et al.*, 2003) e pimenta (CABAÑERO; CARVAJAL, 2007), causando a conseqüente diminuição da condutividade hidráulica das raízes. Esse efeito está relacionado à restrição da via transcelular para o transporte de água do meio externo até o cilindro vascular, devido à inibição da expressão das aquaporinas pelo NaCl (MARTÍNEZ-BALLESTA *et al.*, 2003).

### 3.4.6 A manutenção do fluxo de $K^+$ mais elevado que o de $Na^+$ pode contribuir para a resistência ao estresse salino

O fluxo de  $K^+$  pela seiva de xilema ( $J_K$ ) é superior ao fluxo de  $Na^+$  ( $J_{Na}$ ) nas plantas de feijão caupi tratadas com NaCl. Somente sob NaCl 40 mM, na presença de KCl 1 mM, o  $J_{Na}$  é superior ao  $J_K$ . Assim sendo, não apenas a  $[K^+]_{xil}$  é aumentada sob tratamentos salinos, mas o  $J_K$  é mantido. Nas plantas de pimenta expostas ao NaCl 10 mM por 24 h, o aumento do  $J_{Na}$  é acompanhado pela diminuição do  $J_K$  (CABAÑERO; CARVAJAL, 2007). Em comparação, o  $J_{Na}$  se mantém igual ao  $J_K$  em experimentos de perfusão com raízes de soja utilizando NaCl 12,5 mM na solução externa (LACAN; DURAND, 1995). Esses resultados mostram que as plantas de feijão caupi e soja apresentam maior habilidade para manter o  $J_K$  sob salinidade moderada que as plantas de pimenta. A manutenção do  $J_K$  nas plantas de feijão caupi tratadas com NaCl significa que essas plantas conseguem conservar a taxa de transferência de  $K^+$  das raízes para a parte aérea

mesmo com o aumento da  $[Na^+]_{ext}$ . Essa habilidade pode contribuir para a resistência ao estresse salino pela manutenção do aporte de  $K^+$  na parte aérea.

3.4.7 A exclusão de  $Na^+$  da parte aérea deve depender dos mecanismos para compartimentalização de  $Na^+$  nas raízes

As plantas de feijão caupi tratadas com NaCl apresentam distribuição não-uniforme de  $Na^+$  e  $K^+$  entre as raízes, folhas velhas e folhas novas em todos os experimentos realizados. O conteúdo de  $Na^+$  das raízes pode ser até dez vezes maior que aquele das folhas. Em oposição, o conteúdo de  $K^+$  das folhas é geralmente superior ao encontrado nas raízes. Esse padrão de distribuição sugere que mecanismos de transporte operantes nas raízes devem restringir o envio de  $Na^+$  e manter a transferência de  $K^+$  para as folhas. A exclusão de  $Na^+$  das folhas não deve depender dos mecanismos de carregamento na interface simplasto radicular-xilema, porque esse íon apresenta acesso quase irrestrito à seiva. Ao invés disso, a retenção de  $Na^+$  nas raízes indica fortemente que os mecanismos para a compartimentalização desse íon no vacúolo das células radiculares podem evitar o envio de  $Na^+$  para a parte aérea. A compartimentalização de  $Na^+$  sob estresse salino é realizada principalmente pelas células da epiderme e do córtex externo nas raízes de cevada (PITMAN *et al.*, 1981) e trigo (MUNNS; TESTER, 2008) e pelas células do córtex interno e do estelo nas raízes de *P. coccineus* (KRAMER *et al.*, 1977) e videira (STOREY *et al.*, 2003). Assim, a retenção do  $Na^+$  nas raízes de feijão caupi tratadas com NaCl deve envolver a compartimentalização desse íon nas células radiculares, propiciando uma barreira fisiológica contra a acumulação de  $Na^+$  nas folhas.

A diminuição do conteúdo de  $K^+$  nas raízes de feijão caupi expostas ao NaCl pode envolver a redução da absorção a partir da solução externa, assim como a intensificação da transferência para a parte aérea. Possivelmente, a maior parte do  $K^+$  absorvido tenha sido liberada no xilema e enviada para as folhas. Essa possibilidade é corroborada pelo aumento da  $[K^+]_{xil}$ , pela manutenção do  $J_K$  e pelo o incremento do conteúdo foliar de  $K^+$  sob tratamentos salinos. Desse modo, a compartimentalização de  $Na^+$  nas raízes aliada à intensificação da transferência de  $K^+$  para a parte aérea deve manter a alta relação  $K^+/Na^+$  nas folhas, evitando a toxicidade de  $Na^+$  nos tecidos fotossintetizantes. A retenção de  $Na^+$  nas raízes e a acumulação de  $K^+$  nas folhas nas plantas de *L. albus* (JESCHKE *et al.*, 1986), soja (DURAND; LACAN 1994), feijão comum

(CABOT *et al.*, 2005) e girassol (QUINTERO *et al.*, 2007) expostas ao NaCl indicam que mecanismos similares podem ocorrer em outras dicotiledôneas. Portanto, esses mecanismos podem ser utilizados por essas espécies para evitar distúrbios na homeostase iônica sob estresse salino.

#### 3.4.8 Conclusão

Os resultados do presente trabalho indicam que os mecanismos de transporte localizados na interface simplasto radicular-xilema nas plantas de feijão caupi cultivar Pitiúba apresentam elevada seletividade  $K^+/Na^+$ . O acesso quase irrestrito do  $Na^+$  no xilema radicular sob estresse salino deve ser compensado pelo aumento da liberação de  $K^+$  na seiva e pela manutenção do fluxo de  $K^+$  para a parte aérea. Esses mecanismos, aliados à compartimentalização de  $Na^+$  nas raízes devem propiciar a manutenção da alta relação  $K^+/Na^+$  nas folhas, evitando distúrbios na homeostase iônica nas plantas de feijão caupi sob estresse salino.

#### 3.5 REFERÊNCIAS

APSE, M.P.; BLUMWALD, E.  $Na^+$  transport in plants. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2247-2254, 2007.

BLOM-ZANDSTRA, M.; VOGELZANG, S.A.; VEEN, B.W. Sodium fluxes in sweet peper exposed to varying sodium concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1863-1868, 1998.

CABOT, C.; GARCÍA, M.C.; SIBOLE, J.V. Relation between xylem ion concentration and bean growth responses to short-term salinisation in spring and summer. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 327-334, 2005.

CABAÑERO, F.J.; CARVAJAL, M. Different cation stresses affect specially osmotic root hydraulic conductance, involving aquaporins, ATPase and xylem loading of ions in *Capsicum annuum*, L. plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1300-1310, 2007.

DARLEY, C.P.; WUYTSWINKEL, O.C.M.; WOUDE, K.; MAGER, W.H. *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* *NHX1* genes encode amiloride sensitive electroneutral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. **Biochemical Journal**, v. 351, p. 241-249, 2000.

DAVENPORT, R.J.; MUÑOZ-MAYOR, A.; JHA, D.; ESSAH, P.A.; RUS, A.; TESTER, M. The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in *Arabidopsis*. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 497-507, 2007.

DE BOER, A.H.; WEGNER, L.H. Regulatory mechanisms of ion channels in xylem parenchyma cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 441-449, 1997.

DURAND, M.; LACAN, D. Sodium partitioning within the shoot of soybean. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 65-71, 1994.

FUKUDA, A.; NAKAMURA, A.; TANAKA, Y. Molecular cloning and expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene in *Oryza sativa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1446, p. 149-155, 1999.

GARCIA, A.; RIZZO, C.A.; UD-DIN, J.; BARTOS, S.L.; SENADHIRA, D.; FLOWERS, T.J.; YEO, A.R. Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium: potassium selectivity differs between rice and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p. 1167-1174, 1997.

GAYMARD, F.; PILOT, G.; LACOMBE, B.; BOUCHEZ, D.; BRUNEAU, D.; BOUCHEREZ, J.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; THIBAUD, J.-B.; SENTENAC, H. Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. **Cell**, v. 94, p. 647-655, 1998.

GOLLDACK, D.; SU, H.; QUIGLEY, F.; KAMASANI, U.R.; MUÑOZ-GARAY, C.; BALDERAS, E.; POPOVA, O.V.; BENNETT, J.; BOHNERT, H.J.; PANTOJA, O.

Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. **The Plant Journal**, v. 31, p. 529-542, 2002.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-cultured method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station, circular n° 347, 1950.

JESCHKE, W.D.; PATE, J.S.; ATKINS, C.A. Effects of NaCl salinity on growth, development, ion transport and ion storage in white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Ultra). **Journal of Plant Physiology**, v. 124, p. 257-274, 1986.

KRAMER, D.; LÄUCHLI, A.; YEO, A.R. Transfer cells in roots of *Phaseolus coccineus*: ultrastructure and possible function in exclusion of sodium from the shoot. **Annals of Botany**, v. 41, p. 1031-1040, 1977.

LACAN, D.; DURAND, M. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in excised soybean roots. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 132-138, 1995.

LACAN, D.; DURAND, M. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> exchange at the xylem/symplast boundary. **Plant Physiology**, v. 110, p. 705-711, 1996.

LACOMBE, B.; PILOT, G.; GAYMARD, F.; SENTENAC, H.; THIBAUD, J.-B. pH control of the plant outward-rectifying potassium channel SKOR. **FEBS Letters**, v. 466, p. 351-354, 2000.

MAATHUIS, F.J.M.; AMTMANN, A. K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. **Annals of Botany**, v. 84, p. 123-133, 1999.

MARTÍNEZ-BALLESTRA, M.C.; APARICIO, F.; PALLÁS, V.; MARTÍNEZ, V.; CAVAJAL, M. Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 689-697, 2003.

MÄSER, P.; ECKELMAN, B.; VAIDYANATHAN, R.; HORIE, T.; FAIRBAIRN, D.J.; KUBO, M.; YAMAGAMI, M.; YAMAGUCHI, K.; NISHIMURA, M.; UOZOMI, N.; ROBERTSON, W.; SUSSMAN, M.R.; SCHROEDER, J.I. Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1. **FEBS Letters**, v. 531, p. 157-161, 2002.

MUNNS, R. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in xylem sap flowing to shoots in NaCl-treated barley. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, p. 1032-1042, 1985.

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

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Reviews in Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.

PITMAN, M.G.; LÄUCHLI, A.; STELZER, R. Ion distribution in roots of barley seedlings measured by electron probe X-ray microanalysis. **Plant Physiology**, v. 68, p. 673-679, 1981.

QUINTERO, J.M.; FOURNIER, J.M.; BENLLOCH, M. Na<sup>+</sup> accumulation in shoot is related to water transport in K<sup>+</sup>-starved sunflower plants but not in plants with a normal K<sup>+</sup> status. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 60-67, 2007.

ROBERTS, S.K.; TESTER, M. Inward and outward K<sup>+</sup>-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize root cortex and stele. **The Plant Journal**, v. 8, p. 811-825, 1995.

SCHURR, U. Xylem sap sampling – new approaches to an old topic. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 293-298, 1998.

SHI, H.; QUINTERO, F.J.; PARDO, J.M.; ZHU, J.-K. The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. **The Plant Cell**, v. 14, p. 465-477, 2002.

SHI, H.; ZHU, J.-K. Regulation of expression of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 543-550, 2002.

STOREY, R.; SCHACHTMAN, D.P.; THOMAS, M.R. Root structure and cellular chloride, sodium and potassium distribution in salinized grapevines. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 789-800, 2003.

SUNARPI; HORIE, T.; MOTODA, J.; KUBO, M.; YANG, H.; YODA, K.; HORIE, R.; CHAN, W.-Y.; LEUNG, H.-Y.; HATTORI, K.; KOMONI, M.; OSUMI, M.; YAMAGAMI, M.; SCHROEDER, J.I.; UOZOMI, N. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. **The Plant Journal**, v. 44, p. 928-938, 2005.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.

XIA, T.; APSE, M.P.; AHARON, G.S.; BLUMWALD, E. Identification and characterization of a NaCl-induced vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Beta vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v. 116, p. 206-212, 2002.

WATSON, R.; PRITCHARD, J.; MALONE, M. Direct measurement of sodium and potassium in the transpiration stream of salt-excluding and non-excluding varieties of wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1873-1881, 2001.

WEGNER, L.H.; RASCHKE, K. Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots: a procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch-clamp exploration of salt passageways into xylem vessels. **Plant Physiology**, v. 105, p. 799-813, 1994.

WEGNER, L.H.; DE BOER, A.H. Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K<sup>+</sup> homeostasis and long-distance signaling. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1707-1719, 1997.

WOLF, O.; MUNNS, R.; TONNET, M.L.; JESCHKE, W.D. The role of the stem in the partitioning of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in salt-treated barley. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 697-704, 1991.

WU, S.-J.; DING, L.; ZHU, J.-K. *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. **The Plant Cell**, v. 8, p. 617-627, 1996.

YEO, A.R.; YEO, E.M.; CAPORN, S.J.M.; LACHNO, D.R.; FLOWERS, T.J. The use of <sup>14</sup>C-ethane diol as a quantitative tracer for the transpirational volume flow of water and an investigation of the effects of salinity upon transpiration, net sodium accumulation and endogenous ABA in individual leaves of *Oryza sativa* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, p. 1099-1109, 1985.

ZHU, J.-K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 441-445, 2003.

ZÖRB, C.; NOLL, A.; KARL, S.; LEIB, K.; YAN, F.; SCHUBERT, S. Molecular characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (*ZmNHX*) of maize (*Zea mays* L.) and its expression under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 55-66, 2005.

## CAPÍTULO 4

EFEITOS COMBINADOS DO ESTRESSE SALINO E DA PRIVAÇÃO DE  $K^+$   
SOBRE A ABSORÇÃO, O CARREGAMENTO NO XILEMA E A  
DISTRIBUIÇÃO DE  $K^+$  NAS PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI

#### 4.1 INTRODUÇÃO

As condições ambientais adversas para o crescimento, o desenvolvimento ou a produção das plantas são conhecidas como estresses. Seca, inundação, temperaturas extremas, alta luminosidade, carências nutricionais e salinidade elevada do solo são os principais estresses que acarretam as perdas na produção das espécies cultivadas (BRAY *et al.*, 2000). Estudos sobre estresses em plantas têm se intensificado recentemente, devido aos distúrbios climáticos decorrentes do uso não sustentado dos recursos naturais. Os efeitos dos diferentes fatores ambientais sobre as plantas são geralmente testados de forma isolada. Entretanto, as plantas são rotineiramente submetidas a diferentes combinações de estresses nas condições de campo. Além disso, a resposta molecular e metabólica fornecida para uma combinação específica de dois estresses é única e não pode ser diretamente extrapolada a partir das respostas apresentadas para cada um dos estresses aplicados isoladamente. Desse modo, a investigação das respostas fornecidas pelas plantas aos estresses testados de forma combinada é fundamental para a compreensão dos mecanismos utilizados pelas plantas para superar esses estresses em condições mais próximas da realidade (MITLER, 2006).

A salinidade elevada do solo é um estresse cada vez mais freqüente nos campos de cultivo, especialmente nas áreas áridas e semi-áridas (MUNNS, 2005). Nessas áreas, o estresse salino pode ocorrer simultaneamente com seca, alta temperatura, luminosidade elevada ou carências nutricionais (BRAY *et al.*, 2000). Os solos salinos são caracterizados pelo acúmulo de sais solúveis, principalmente o NaCl (MUNNS, 2005). A concentração elevada de Na<sup>+</sup> na solução do solo está freqüentemente associada à escassez de K<sup>+</sup> (RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2000). Além disso, a similaridade físico-química entre Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> permite a competição entre esses íons pelos sítios de ligação nos transportadores de membrana e nas enzimas (MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Nas raízes, a aquisição do K<sup>+</sup> pode ser prejudicada, induzindo a deficiência desse nutriente (ASHLEY *et al.*, 2006). Nas folhas, a deficiência do K<sup>+</sup> compromete a atividade das enzimas dependentes desse nutriente, as quais estão envolvidas na fotossíntese, na respiração e na biossíntese de proteínas (APSE; BLUMWALD, 2007). Dessa maneira, a salinidade elevada e a privação de K<sup>+</sup> consistem em estresses interativos que podem agravar distúrbios na homeostase iônica das plantas.

A distribuição não-uniforme de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  nas plantas submetidas ao estresse salino tem sido vinculada à resistência contra a toxicidade de  $\text{Na}^+$  nas espécies glicófitas (DURAND; LACAN, 1994; JESCHKE *et al.*, 1986; WOLF; JESCHKE, 1987). Enquanto raízes, caules, pecíolos, bainhas e folhas velhas estão envolvidos na retenção de  $\text{Na}^+$ , flores, frutos e especialmente folhas novas acumulam mais  $\text{K}^+$  que  $\text{Na}^+$  (BLOM-ZANDSTRA *et al.*, 1998; CABOT *et al.*, 2005; DAVENPORT *et al.*, 2005; DURAND; LACAN, 1994; JESCHKE *et al.*, 1986; WOLF *et al.*, 1991; YEO *et al.*, 1985). Dessa forma, os tecidos fotossintetizantes são protegidos contra a toxicidade de  $\text{Na}^+$  pela manutenção da elevada relação  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  nas folhas (MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Essa habilidade para excluir o  $\text{Na}^+$  das folhas ou elevada seletividade  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  tem sido investigada como caráter hereditário vinculado a loci mapeados em algumas espécies cultivadas (GARCIA *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 2006; JAMES *et al.*, 2006). No entanto, o fenótipo excludor deve depender dos mecanismos de transporte que discriminam o  $\text{K}^+$  do  $\text{Na}^+$  nas interfaces solo-simplasto radicular-xilema (MAATHUIS; AMTMANN, 1999). De fato, os mecanismos de absorção e carregamento no xilema devem ser capazes de manter a aquisição do  $\text{K}^+$  pelas raízes e garantir a transferência seletiva desse íon para a parte aérea, mesmo sob o excesso de  $\text{Na}^+$  e a escassez de  $\text{K}^+$  no meio externo.

A aquisição de  $\text{K}^+$  pelas raízes das plantas é mantida sob baixa disponibilidade desse nutriente por mecanismos de absorção de alta afinidade (EPSTEIN *et al.*, 1963). Esses mecanismos operam em concentrações externas micromolares de  $\text{K}^+$ , apresentam baixa afinidade pelo  $\text{Na}^+$  (EPSTEIN *et al.*, 1963; MAATHUIS; SANDERS, 1994) e são mediados por uma via sensível e uma via insensível ao  $\text{NH}_4^+$  (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007; SANTA-MARÍA *et al.*, 2000; SPALDING *et al.*, 1999). A via sensível ao  $\text{NH}_4^+$  envolve a atividade dos transportadores pertencentes às famílias KT/HAK/KUP e HKT (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005; NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007; SANTA-MARÍA *et al.*, 2000). Os HAKs devem atuar como co-transportadores  $\text{H}^+/\text{K}^+$  (RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2000), enquanto os HKTs apresentam atividade de co-transporte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (FAIRBAIRN *et al.*, 2000; GRASSMAN *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2001) ou agem como transportadores de  $\text{Na}^+$  que apresentam baixa afinidade (HORIE *et al.*, 2001; UOZOMI *et al.*, 2000). Membros de ambas as famílias são expressos nas raízes e são induzidos sob privação de  $\text{K}^+$  (HORIE *et al.*, 2001; MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005; NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007; SANTA-MARÍA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 1998). Ainda, a via insensível ao  $\text{NH}_4^+$  depende dos canais de  $\text{K}^+$  da família AKT/KAT (HIRSH *et al.*,

1998; MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005; SANTA-MARÍA *et al.*, 2000; SPALDING *et al.*, 1999). Essa família inclui canais do tipo “Shaker” ativados sob hiperpolarização da membrana, atuando como canais retificadores de entrada de  $K^+$  (KIRCs) (HARTJE *et al.*, 2000; ZIMMERMANN *et al.*, 1998). Os AKTs também são expressos nas raízes, mas não são induzidos sob deficiência de  $K^+$  (GOLLDACK *et al.*, 2003; LAGARDE *et al.*, 1996).

A transferência de  $K^+$  para a parte aérea após a absorção do meio externo é realizada pela corrente transpiratória via xilema. O carregamento de  $K^+$  nos elementos de vaso é desempenhado pelas células parenquimáticas do xilema (XPCs) (ROBERTS; TESTER, 1995; WEGNER; RASCHKE, 1994). Essas células apresentam canais retificadores de saída de  $K^+$  (KORCs), ativados por despolarização da membrana, que medeiam a liberação de  $K^+$  para a seiva (GAYMARD *et al.*, 1998; ROBERTS; TESTER, 1995; WEGNER; RASCHKE, 1994). As condições termodinâmicas associadas ao transporte de  $K^+$  na interface XPCs-elementos de vaso são favoráveis à transferência desse íon para a seiva, tanto em relação ao potencial da membrana, quanto ao gradiente de  $K^+$  (ROBERTS; TESTER, 1995; WEGNER; RASCHKE, 1994). Apesar disso, a atividade dos KORCs deve ser regulada pela concentração de  $K^+$  no apoplasto do estelo, a qual deve refletir a demanda da parte aérea sinalizada pela recirculação via floema (WEGNER; DEBOER, 1997).

A absorção de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade, bem como o carregamento de  $K^+$  no xilema, envolve transportadores específicos para esse nutriente. De fato, os HAKs (SANTA-MARÍA *et al.*, 1997), AKTs (HARTJE *et al.*, 2000; ZIMMERMANN *et al.*, 1998) e KORCs (ROBERTS; TESTER, 1997; WEGNER; DEBOER, 1997) apresentam elevada seletividade  $K^+/Na^+$ . No entanto, a entrada de  $Na^+$  no simplasto radicular e a sua transferência para a parte aérea deve ser viabilizada pelos transportadores com baixa capacidade para discriminar  $K^+$  de  $Na^+$ . A absorção de  $Na^+$  por mecanismos de baixa afinidade tem sido atribuída fundamentalmente aos canais de cátions não-seletivos (NSCCs) (ESSAH *et al.*, 2003; RUBIO *et al.*, 2003) e a liberação desse íon no xilema tem sido relacionada ao vazamento apoplástico através da endoderme (YADAV *et al.*, 1996) ou aos canais retificadores de saída não seletivos (NORCs) (WEGNER; DEBOER, 1997). Tanto os NSCCs (DAVENPORT; TESTER, 2000; DEMIDCHIK; TESTER, 2002) quanto os NORCs (DEBOER; WEGNER, 1997; WEGNER; RASCHKE, 1994) apresentam baixa seletividade pelos cátions monovalentes.

Embora os mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  sejam extensamente estudados em plantas sob estresse salino, poucas iniciativas estão voltadas à compreensão dos efeitos interativos da elevada salinidade e da privação de  $\text{K}^+$  sobre esses mecanismos. Nesse sentido, o presente trabalho pretende caracterizar as vias de absorção de  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi cultivar Pitiúba e constatar a interferência causada pelo  $\text{Na}^+$  nas diferentes vias. Além disso, o carregamento de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  no xilema e a distribuição desses íons pelos diferentes órgãos são investigados sob a exposição combinada ao  $\text{NaCl}$  e à privação de  $\text{K}^+$ . Discute-se o efeito sinérgico desses estresses sobre a homeostase iônica nas plantas de feijão caupi.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Material vegetal

Esse trabalho foi realizado com plantas de feijão caupi cultivar Pitiúba obtidas a partir de sementes. As sementes foram germinadas de acordo com os procedimentos descritos no item 2.2.1.

### 4.2.2 Experimentos com raízes destacadas

Para caracterizar as vias de absorção  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi, foram realizados experimentos de influxo utilizando a técnica de raízes destacadas (HUANG *et al.*, 1992). Assim, plântulas de quatro dias em estágio de gancho plumular foram transferidas para caixas plásticas com 20 L de solução nutritiva completa (HOAGLAND; ARNON, 1950) contendo  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  625  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  250  $\mu\text{M}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KNO}_3$  500  $\mu\text{M}$ , Fe-EDTA 25  $\mu\text{M}$  e micronutrientes ( $\text{HBO}_3$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2$  2,25  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  0,75  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  1,75  $\mu\text{M}$  e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0,025  $\mu\text{M}$ ), pH 6,0. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação. Após três dias, a solução nutritiva completa foi trocada por solução modificada sem  $\text{K}^+$ , contendo  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  750  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  250  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  62,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ , Fe-EDTA 25  $\mu\text{M}$  e micronutrientes, pH 6,0. Quando as plantas foram crescidas na

ausência do  $\text{NH}_4^+$ , essa solução foi alterada para  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  875  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  62,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ , Fe-EDTA 25  $\mu\text{M}$  e micronutrientes, pH 6,0. As plantas permaneceram em casa de vegetação por mais quatro dias.

Plantas de onze dias com a primeira folha trifoliolada expandida foram utilizadas nos experimentos de influxo de  $\text{K}^+$ . Assim sendo, as plantas foram coletadas e as raízes foram destacadas da parte aérea e lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM à temperatura ambiente por 20 min. Logo depois, as raízes foram gentilmente secadas em papel toalha e transferidas para frascos de Erlenmeyer com 25 mL de meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM e demais adições, de acordo com o experimento. Para testar o efeito do tempo, as raízes foram expostas a meio de incubação adicionado de KCl 100  $\mu\text{M}$  por 0, 5, 10, 20, 40, 80 e 120 min a 30°C. Quando o efeito da dose de  $\text{K}^+$  foi testada, as raízes foram tratadas com meio de incubação acrescido de KCl 0, 10, 20, 40, 80, 120 e 200  $\mu\text{M}$  a 30°C por 30 min.

Quando  $\text{Na}^+$  e bloqueadores de canais de  $\text{K}^+$  foram utilizados, as raízes foram lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM com concentrações definidas dessas substâncias, à temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, as raízes foram mantidas em meio de incubação suplementado com KCl 100  $\mu\text{M}$  e as mesmas concentrações de  $\text{Na}^+$  e bloqueadores usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 1 h. Para testar o efeito do  $\text{NH}_4^+$ , as raízes de plantas crescidas na ausência e na presença do  $\text{NH}_4^+$  foram lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM com concentrações crescentes de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , à temperatura ambiente por 20 min. Logo depois, as raízes foram expostas a meio de incubação com KCl 100  $\mu\text{M}$  e as mesmas concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  utilizadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 1 h. Ao final de todos os experimentos, amostras do meio de incubação foram coletadas para determinação da concentração de  $\text{K}^+$  e as raízes foram coletadas, secadas a 70°C por 48 h e pesadas para determinação da massa seca.

#### 4.2.3 Experimentos com plantas completas

Experimentos com plantas completas foram conduzidos para investigar o efeito combinado da privação de  $\text{K}^+$  e da exposição ao  $\text{Na}^+$  sobre o carregamento de  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  no xilema e sobre a distribuição desses íons nas plantas de feijão caupi. Desse modo, plântulas de quatro dias em estágio de gancho plumular foram transferidas para vasos plásticos com 0,9 L de solução nutritiva completa ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  625  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  250  $\mu\text{M}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4$  125  $\mu\text{M}$ ,

KNO<sub>3</sub> 500 µM, Fe-EDTA 25 µM e micronutrientes), pH 6,0. As plantas permaneceram em condições de casa de vegetação. Após três dias, as plantas foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo foi pré-tratado trocando-se a solução nutritiva completa por solução modificada sem K<sup>+</sup> (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 750 µM, NH<sub>4</sub>Cl 250 µM, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 62,5 µM, MgSO<sub>4</sub> 125 µM, Fe-EDTA 25 µM e micronutrientes), pH 6,0. O segundo grupo, por sua vez, foi pré-tratado com solução modificada contendo KCl 1 mM, pH 6,0. Depois de mais quatro dias, cada grupo foi dividido em dois subgrupos para aplicação dos tratamentos.

#### Carregamento de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> no xilema

Um subgrupo pré-tratado sem K<sup>+</sup> e um com K<sup>+</sup> foram expostos à solução modificada contendo KCl 1 mM e sem Na<sup>+</sup> (tratamentos -KNa0 e +KNa0, respectivamente). Os subgrupos pré-tratados sem K<sup>+</sup> e com K<sup>+</sup> restantes foram tratados com solução modificada contendo KCl 1 mM e NaCl 40 mM (tratamentos -KNa40 e +KNa40, respectivamente). As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 24 h, procedendo-se a coleta da seiva de xilema pela técnica de exudação radicular (SCHURR, 1998). Para tanto, o caule foi cortado em bixel a 3 cm da raiz. A primeira gota exudada foi descartada e as seguintes foram coletadas durante 60 min, sendo acondicionadas em tubos de microcentrífuga mantidos no gelo. As amostras foram congeladas a -20°C até a determinação das concentrações de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>. Além disso, as raízes, folhas velhas (cordiformes) e folhas novas (trifolioladas) também foram coletadas para determinação do conteúdo de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>.

#### Distribuição de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>

Um subgrupo pré-tratado sem K<sup>+</sup> foi exposto à solução modificada sem K<sup>+</sup> e sem Na<sup>+</sup> (tratamento K0Na0) e o outro foi mantido em solução sem K<sup>+</sup> adicionada de NaCl 40 mM (tratamento K0Na40). Além disso, um subgrupo pré-tratado com K<sup>+</sup> foi exposto à solução modificada com KCl 1 mM e sem Na<sup>+</sup> (tratamento K1Na0) e o outro permaneceu em solução com KCl 1 mM e NaCl 40 mM (tratamento K1Na40). As plantas foram mantidas em casa de vegetação por mais três dias. Em seguida, as plantas foram coletadas e divididas em raízes, caule, folhas velhas (cordiformes), limbos e pecíolos das folhas novas (trifolioladas). Para cada uma dessas partes, foram realizadas determinações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>.

#### 4.2.4 Determinação de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>

As determinações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram realizadas pela técnica de fotometria de chama. Dessa forma, as amostras do meio de incubação coletadas nos experimentos de influxo de K<sup>+</sup> foram lidas diretamente em fotômetro de chama (Micronal, modelo B462) calibrado com soluções padrões de KCl na faixa de 100 a 200 µM. Além disso, as amostras de seiva de xilema obtidas foram diluídas de 20 a 40 vezes com água destilada deionizada e lidas após calibração com soluções padrões de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> 50 ppm.

As amostras secas das partes coletadas foram pulverizadas com gral e pistilo e mantidas em frascos plásticos fechados à temperatura ambiente até a determinação do conteúdo de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Amostras de 50 mg de massa seca pulverizada foram extraídas com 10 mL de água destilada deionizada a 100°C por 60 min em tubos hermeticamente fechados. Depois do resfriamento, os extratos foram filtrados em algodão e as leituras foram realizadas em fotômetro de chama calibrado com soluções padrões de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> 50 ppm.

#### 4.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos conforme delineamento inteiramente casualizado. Em experimentos com raízes destacadas, foram realizadas cinco repetições por tratamento e cada repetição correspondeu a um frasco contendo um sistema radicular individual. Em experimentos com plantas completas, cada tratamento foi conduzido com quatro repetições e um vaso contendo duas plantas consistiu em uma unidade experimental. Os resultados obtidos nos experimentos tempo-dependente e dose-dependente com raízes destacadas foram analisados por regressão não-linear. Os resultados dos demais experimentos foram submetidos à análise de variância seguida do teste de comparação de médias de Tukey ao nível de significância de 5%.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Caracterização cinética da absorção de $K^+$ por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi

Plantas privadas de  $K^+$  foram utilizadas em experimentos de influxo para caracterizar cineticamente a absorção de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi cultivar Pitiúba. As raízes de plantas privadas de  $K^+$  foram capazes de absorver esse nutriente do meio de incubação a partir de 100  $\mu M$  até concentrações tão baixas quanto 4  $\mu M$  em apenas 120 min (Fig. 4.1A). A quantidade de  $K^+$  absorvida por unidade de massa (expressa em  $\mu mol g^{-1} MS$ ) aumentou progressivamente no decorrer do tempo de exposição, tendendo à estabilização a partir de 80 min (Fig. 4.1B). Levando em conta esses resultados, o tempo de exposição de 30 min foi escolhido para testar o efeito da dose de  $K^+$ , pois períodos mais prolongados poderiam acarretar a estabilização do influxo líquido de  $K^+$ , especialmente em concentrações externas mais elevadas. Além disso, períodos menos prolongados poderiam reduzir fortemente a quantidade de  $K^+$  absorvida por unidade de massa, prejudicando a verificação de alterações no influxo líquido em função da concentração externa de  $K^+$ . Para os demais experimentos, o tempo de exposição de 60 min foi padronizado, pois esse período se mostrou mais adequado para a verificação de diferenças significativas no influxo líquido de  $K^+$  entre o controle e os tratamentos com diferentes inibidores.

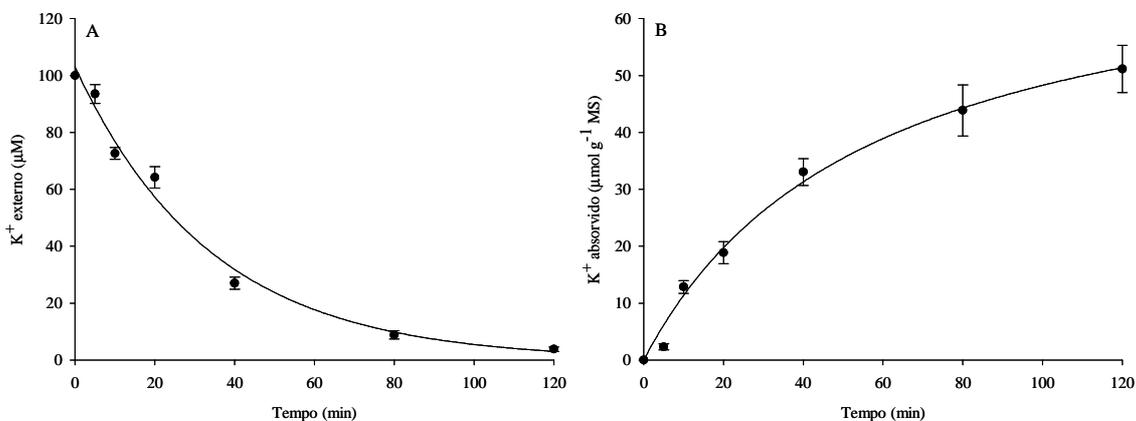


Figura 4.1 – Efeito do tempo de exposição ao  $K^+$  externo sobre a depleção de  $K^+$  (A) e a quantidade de  $K^+$  absorvida por unidade de massa (B) por raízes de feijão caupi privadas desse cátion. As plantas foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) por três dias em casa de vegetação. Em seguida, a solução completa foi trocada por solução modificada sem  $K^+$  (conforme Material e Métodos). As plantas permaneceram mais quatro dias em casa de vegetação e foram coletadas. As raízes foram destacadas da parte aérea e lavadas em  $CaCl_2$  0,1 mM à temperatura ambiente por 20 min. essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $CaCl_2$  0,1 mM e KCl 100  $\mu$ M, permanecendo a 30°C por 0, 5, 10, 20, 40, 80 e 100 min. Os pontos representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. A análise dos resultados por regressão não-linear permitiu o seu ajuste a funções do tipo decaimento exponencial ( $R^2 = 0,98$ ) em (A) e hipérbole retangular ( $R^2 = 0,99$ ) em (B).

O efeito da dose de  $K^+$  foi analisado por regressão não-linear, possibilitando o ajuste dos valores obtidos ao modelo de Michaelis-Menten, descrito pela função do tipo hipérbole retangular ( $R^2 = 0,98$ ) (Fig. 4.2). O influxo líquido de  $K^+$  demonstrou acréscimo significativo conforme o aumento da concentração externa de  $K^+$ , estabilizando a partir de 120  $\mu$ M. Assim sendo, absorção de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi cultivar Pitiúba apresentou cinética de saturação característica. Utilizando o modelo de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco), os valores transformados foram ajustados à função polinomial do tipo linear ( $R^2 = 0,98$ ) e as constantes cinéticas  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  foram estimadas em 1,39  $\mu$ mol  $g^{-1}$  MS  $min^{-1}$  e 65  $\mu$ M, respectivamente.

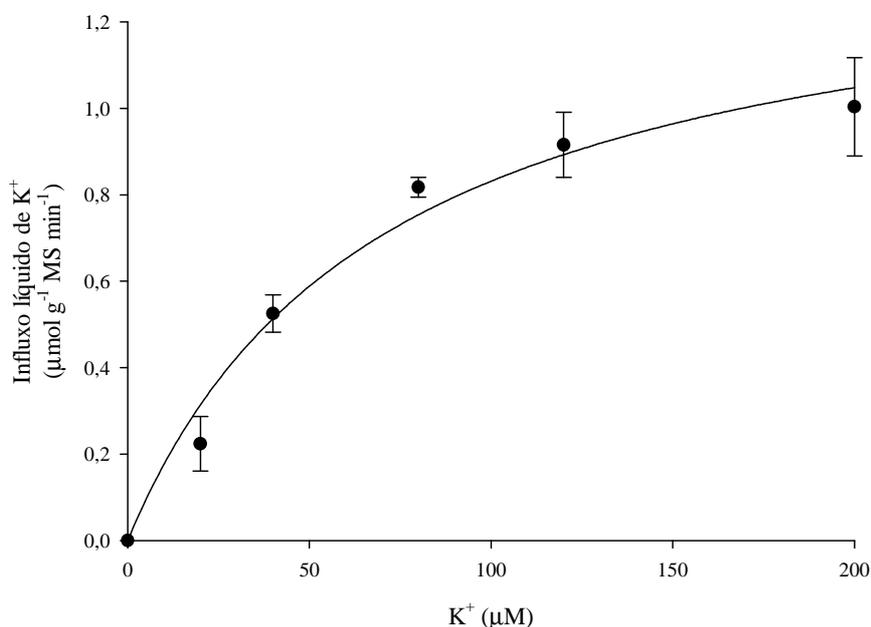


Figura 4.2 – Efeito da concentração externa de  $K^+$  sobre o influxo líquido de  $K^+$  nas raízes de feijão caupi privadas desse cátion. As raízes destacadas foram lavadas em  $CaCl_2$  0,1 mM à temperatura ambiente por 20 min. essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $CaCl_2$  0,1 mM e KCl 0, 10, 20, 40, 80, 120 e 200  $\mu M$ , permanecendo a 30°C por 30 min. Os pontos representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. A análise dos resultados por regressão não-linear possibilitou o seu ajuste à função do tipo hipérbola retangular ( $R^2 = 0,98$ ). As constantes cinéticas  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  foram estimadas em 1,39  $\mu mol\ g^{-1}\ MS\ min^{-1}$  e 65  $\mu M$ , respectivamente.

#### 4.3.2 A absorção de $K^+$ por mecanismos de alta afinidade depende de uma via sensível e uma via insensível ao $NH_4^+$

As plantas crescidas na ausência e na presença do  $NH_4^+$  foram utilizadas em experimentos de influxo de  $K^+$  para determinar o efeito inibitório do  $NH_4^+$  sobre a absorção de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi. O influxo líquido de  $K^+$  em meio de incubação sem  $NH_4^+$  não diferiu significativamente entre raízes crescidas na ausência e na presença do  $NH_4^+$  (Fig. 4.3). No entanto, o tratamento com  $NH_4^+$  0,25 mM causou até 67% de redução no influxo líquido de  $K^+$  nas raízes crescidas na ausência do  $NH_4^+$ , mas ocasionou apenas 47% de redução naquele verificado nas raízes crescidas na presença do  $NH_4^+$ , em referência aos respectivos controles. O influxo líquido de  $K^+$  nas raízes crescidas na ausência e na presença do  $NH_4^+$  foi diminuído em cerca de 90% pelo tratamento com  $NH_4^+$  0,50 mM, em relação aos respectivos controles, não apresentando diferença significativa entre si. Desse modo, a absorção

de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi cultivar Pitiúba foi mediada por uma via majoritária sensível ao  $NH_4^+$  e uma via minoritária insensível ao  $NH_4^+$ , tanto nas raízes crescidas na ausência quanto na presença desse cátion. Ainda, a via sensível ao  $NH_4^+$  foi mais fortemente inibida nas raízes crescidas na ausência do  $NH_4^+$  pelo tratamento com  $NH_4^+$  0,25 mM.

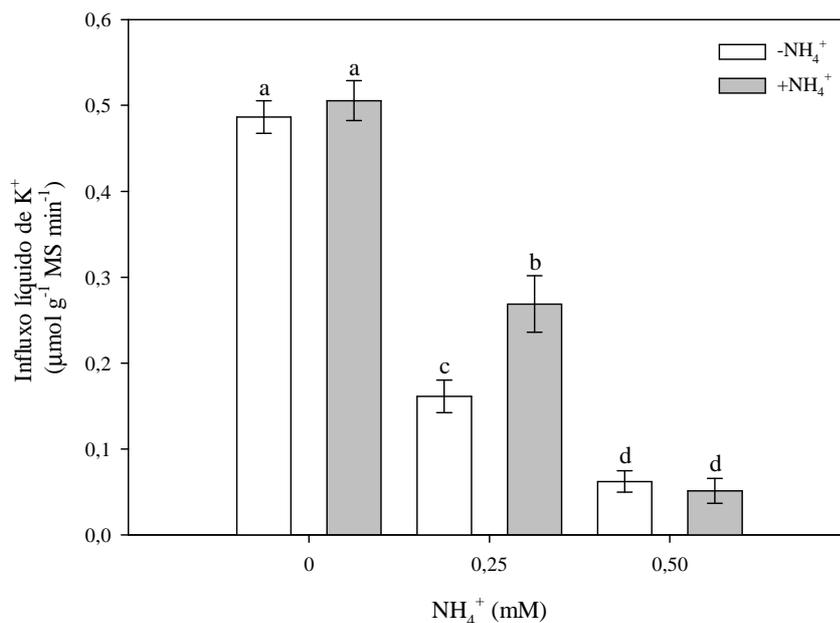


Figura 4.3 – Efeito da concentração externa de  $NH_4^+$  sobre o influxo líquido de  $K^+$  nas raízes de feijão caupi privadas de  $K^+$  e crescidas na ausência ou na presença de  $NH_4^+$ . As plantas foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) ou em solução com  $K^+$  e sem  $NH_4^+$  (conforme Material e Métodos), por três dias em casa de vegetação. Em seguida, as soluções foram trocadas por solução modificada sem  $K^+$  e sem ou com  $NH_4^+$  (conforme Material e Métodos). As plantas permaneceram mais quatro dias em casa de vegetação e foram coletadas. As raízes destacadas foram lavadas em  $CaCl_2$  0,1 mM sem  $NH_4Cl$  ou com  $NH_4Cl$  0,25 e 0,50 mM, à temperatura ambiente por 20 min. essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $CaCl_2$  0,1 mM,  $KCl$  100  $\mu\text{M}$  e as mesmas concentrações de  $NH_4Cl$  usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

#### 4.3.3 Os canais de $K^+$ contribuem minoritariamente para a absorção de $K^+$ por mecanismos de alta afinidade

Com o intuito de verificar a contribuição dos canais de  $K^+$  na absorção de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi, tratamentos foram conduzidos com os inibidores farmacológicos  $Cs^+$ , tetraetilamônio ( $TEA^+$ ) e  $Ba^{2+}$ . Os tratamentos com  $Cs^+$  0,1 mM e  $Ba^{2+}$  1,0 mM causaram aproximadamente 20% de inibição do influxo líquido de  $K^+$ , em

comparação com o controle, não apresentando diferença significativa entre si (Fig. 4.4). Em oposição, o tratamento com TEA<sup>+</sup> 10 mM não causou alteração significativa do influxo líquido de K<sup>+</sup> em referência ao controle. Mesmo o tratamento com TEA<sup>+</sup> 20 mM (dados não mostrados) se mostrou estatisticamente equivalente ao controle. Assim, esses resultados demonstraram que os canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao Cs<sup>+</sup> e ao Ba<sup>2+</sup>, mas insensíveis ao TEA<sup>+</sup>, contribuem minoritariamente para a absorção de K<sup>+</sup> por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi.

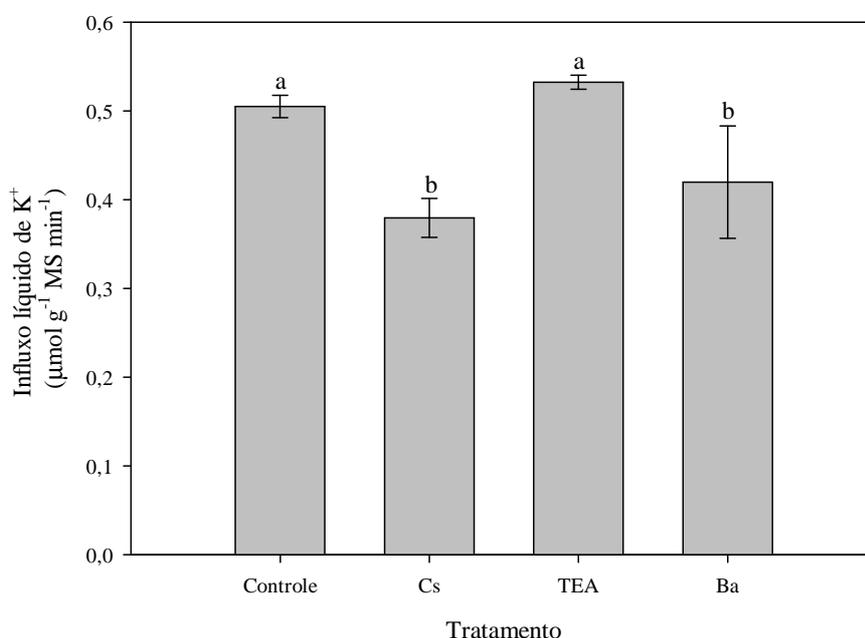


Figura 4.4 – Efeito de bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> sobre o influxo líquido de K<sup>+</sup> nas raízes de feijão caupi privadas desse cátion. As plantas foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) por três dias em casa de vegetação. Em seguida, a solução completa foi trocada por solução modificada sem K<sup>+</sup> (conforme Material e Métodos). As plantas permaneceram mais quatro dias em casa de vegetação e foram coletadas. As raízes destacadas foram lavadas em CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM sem adições (controle) ou com CsCl 0,1 mM (Cs), TEA<sup>+</sup> 10 mM (TEA) ou BaCl<sub>2</sub> 1,0 mM (Ba), à temperatura ambiente por 20 min. essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, KCl 100 µM e as mesmas concentrações de bloqueadores usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

#### 4.3.4 Concentrações micromolares de Na<sup>+</sup> promovem a absorção de K<sup>+</sup> por mecanismos de alta afinidade

O efeito competitivo de Na<sup>+</sup> sobre a absorção de K<sup>+</sup> por mecanismos de alta afinidade foi testado nas raízes de feijão caupi por meio de tratamentos com concentrações externas crescentes

de  $\text{Na}^+$ . Inesperadamente, os tratamentos com  $\text{Na}^+$  0,1 e 0,5 mM aumentaram o influxo líquido de  $\text{K}^+$  em 27 e 33%, respectivamente, em comparação com o controle (Fig. 4.5). O tratamento com  $\text{Na}^+$  1 mM não diferiu significativamente do controle. No entanto, os tratamentos com  $\text{Na}^+$  5 e 10 mM diminuíram o influxo líquido de  $\text{K}^+$  em 25 e 30%, respectivamente, em relação ao controle. Dessa forma, concentrações micromolares de  $\text{Na}^+$  estimularam a absorção de  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi, enquanto concentrações milimolares inibiram parcialmente esse processo.

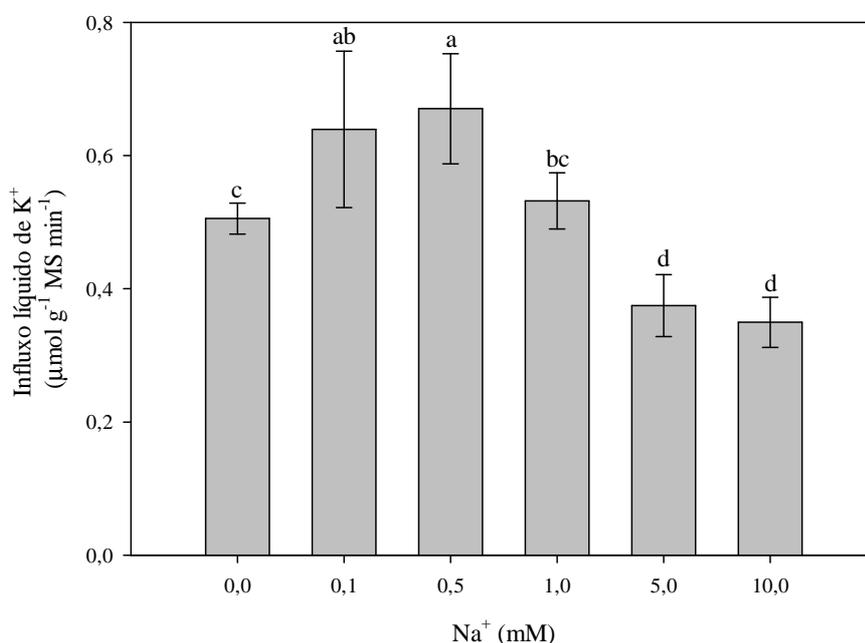


Figura 4.5 – Efeito da concentração externa de  $\text{Na}^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{K}^+$  nas raízes de feijão caupi privadas de  $\text{K}^+$ . As raízes destacadas foram lavadas em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM sem  $\text{NaCl}$  ou com  $\text{NaCl}$  0,1, 0,5, 1, 5 e 10 mM à temperatura ambiente por 20 min. essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM,  $\text{KCl}$  100  $\mu\text{M}$  e as mesmas concentrações de  $\text{NaCl}$  usadas nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

#### 4.3.5 Efeito interativo de $\text{Na}^+$ e inibidores farmacológicos sobre a absorção de $\text{K}^+$ por mecanismos de alta afinidade

Para verificar o efeito interativo de  $\text{Na}^+$  com  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$  e  $\text{Ba}^{2+}$ , tratamentos combinados desses cátions foram testados. Além dos tratamentos isolados com  $\text{NH}_4^+$  0,25 mM,  $\text{Cs}^+$  0,1 mM,  $\text{Ba}^{2+}$  1,0 mM e  $\text{Na}^+$  10 mM, foram conduzidos tratamentos com  $\text{NH}_4^+$  0,25 mM,  $\text{Cs}^+$  0,1 mM ou

$\text{Ba}^{2+}$  1,0 mM, adicionados de  $\text{Na}^+$  10 mM. Os tratamentos isolados com  $\text{NH}_4^+$  0,25 mM,  $\text{Cs}^+$  0,1 mM,  $\text{Ba}^{2+}$  1,0 mM e  $\text{Na}^+$  10 mM causaram diminuição de 47, 23, 20 e 30% no influxo líquido de  $\text{K}^+$ , respectivamente, em relação ao controle (Fig. 4.6). Já os tratamentos combinados de  $\text{NH}_4^+$  0,25 mM com  $\text{Na}^+$  10 mM e  $\text{Cs}^+$  0,1 mM com  $\text{Na}^+$  10 mM, reduziram ainda mais o influxo líquido de  $\text{K}^+$ , alcançando 70 e 42% de inibição, respectivamente, em comparação com o controle. Apesar disso, o tratamento combinado de  $\text{Ba}^{2+}$  1,0 mM com  $\text{Na}^+$  10 mM foi estatisticamente equivalente ao controle. Esses resultados indicaram que  $\text{Na}^+$  apresentou efeito sinérgico com  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Cs}^+$ , pois os tratamentos combinados aumentaram a inibição causada por esses cátions sobre o influxo líquido de  $\text{K}^+$ , em comparação com os tratamentos isolados. Inversamente,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ba}^{2+}$  demonstraram efeitos antagônicos, uma vez que o tratamento combinado desses cátions não apresentou efeito inibitório sobre o influxo líquido de  $\text{K}^+$ , enquanto os tratamentos isolados ocasionaram a redução desse parâmetro.

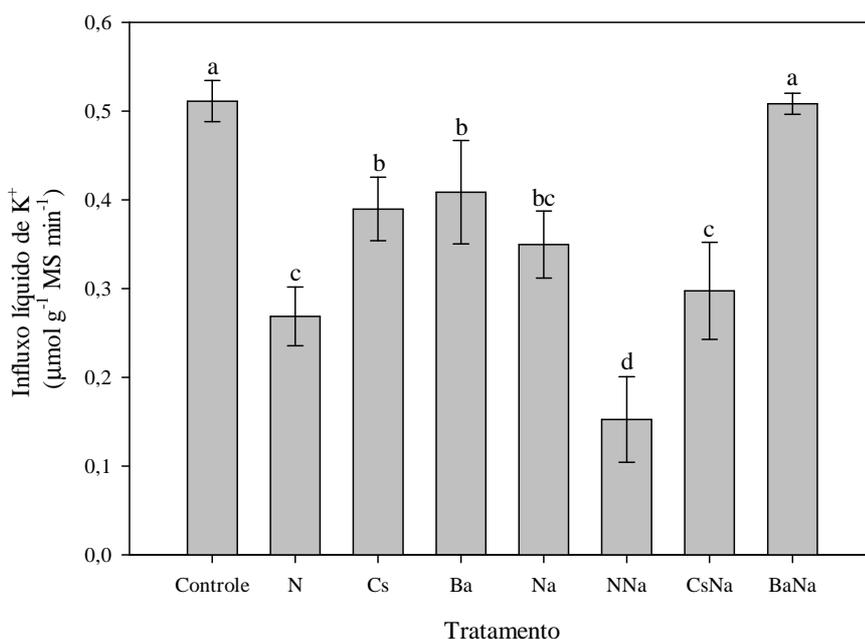


Figura 4.6 – Efeito interativo de  $\text{Na}^+$  com  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$  e  $\text{Ba}^{2+}$  sobre o influxo líquido de  $\text{K}^+$  nas raízes de feijão caupi privadas de  $\text{K}^+$ . As raízes destacadas foram lavadas à temperatura ambiente por 20 min em  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM sem adições (controle), com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,25 mM (N),  $\text{CsCl}$  0,1 mM (Cs),  $\text{BaCl}_2$  1,0 mM (Ba) ou  $\text{NaCl}$  10 mM (Na), além de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,25 mM,  $\text{CsCl}$  0,1 mM ou  $\text{BaCl}_2$  1,0 mM com  $\text{NaCl}$  10 mM (NNa, CsNa e BaNa, respectivamente). Essas raízes foram transferidas para meio de incubação contendo MES-Tris 2,0 mM pH 6,0,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM,  $\text{KCl}$  100  $\mu\text{M}$  e as mesmas concentrações dos diferentes compostos usados nas lavagens, permanecendo a 30°C por 60 min. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

4.3.6 A privação de  $K^+$  reduz a capacidade apresentada pelas plantas de feijão caupi para aumentar o carregamento de  $K^+$  no xilema e reduzir o fluxo de  $Na^+$  para a parte aérea sob tratamento salino

As plantas previamente privadas ou supridas de  $K^+$  e não expostas ao  $Na^+$  apresentaram concentração de  $Na^+$  na seiva de xilema ( $[Na^+]_{xil}$ ) de aproximadamente 2 mM (Fig. 4.7A). Comparativamente, nas plantas previamente privadas ou supridas de  $K^+$  e tratadas com NaCl 40 mM, a  $[Na^+]_{xil}$  aumentou quase 20 vezes em relação às plantas não tratadas, alcançando aproximadamente 39 mM. A concentração de  $K^+$  na seiva de xilema ( $[K^+]_{xil}$ ) nas plantas previamente privadas de  $K^+$  e não expostas ao  $Na^+$  atingiu 16 mM, enquanto aquela verificada nas plantas previamente supridas de  $K^+$  e não tratadas com  $Na^+$  foi de apenas 13 mM (Fig. 4.7B). Inesperadamente, a exposição ao tratamento salino ocasionou aumento significativo da  $[K^+]_{xil}$ . Nas plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$  e expostas ao NaCl 40 mM, a  $[K^+]_{xil}$  alcançou 19 e 24 mM, correspondendo a um aumento de 15 e 79%, nessa ordem, em referência às respectivas plantas não expostas. Desse modo, as plantas previamente supridas de  $K^+$  apresentaram maior habilidade que as privadas desse nutriente para compensar o carregamento de  $Na^+$  no xilema sob tratamento salino pela intensificação da liberação de  $K^+$ . Ainda, a relação  $K^+/Na^+$  na seiva de xilema das plantas previamente privadas de  $K^+$  e não tratadas com  $Na^+$  foi três vezes maior que aquela verificada para plantas previamente supridas de  $K^+$  e não expostas ao  $Na^+$  (Fig. 4.7C). No entanto, o tratamento com NaCl 40 mM causou diminuição significativa dessa relação tanto nas plantas previamente privadas quanto nas plantas previamente supridas de  $K^+$ , as quais apresentaram relação  $K^+/Na^+$  similar.

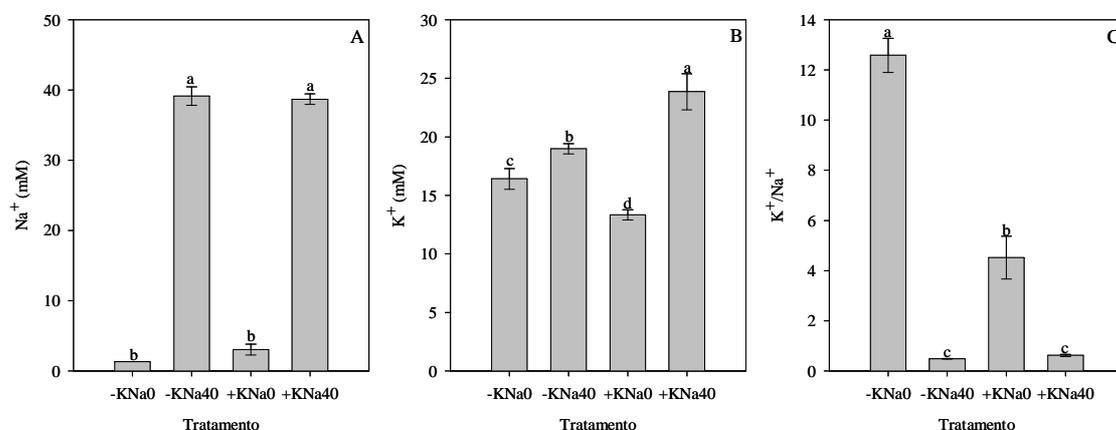


Figura 4.7 – Efeito da privação de  $K^+$  seguida da exposição ao  $Na^+$  sobre a concentração de  $Na^+$  (A) e  $K^+$  (B) e a relação  $K^+/Na^+$  (C) na seiva de xilema em plantas de feijão caupi. As plantas foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) por três dias em casa de vegetação. Em seguida, essas plantas foram pré-tratadas com solução modificada sem KCl ou com KCl 1 mM (conforme Material e Métodos) e mantidas mais quatro dias em casa de vegetação. Um grupo pré-tratado sem KCl e um pré-tratado com KCl 1 mM foram expostos à solução modificada contendo KCl 1 mM (tratamentos -KNa0 e +KNa0, respectivamente); os grupos pré-tratados sem KCl e com KCl 1 mM restantes foram mantidos em solução modificada contendo KCl 1 mM e NaCl 40 mM (tratamentos -KNa40 e +KNa40, nessa ordem). Após 24 h, a seiva de xilema foi coletada pela técnica de exsudação radicular. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de quatro repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

O fluxo de seiva ( $J_V$ ) nas plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$  e não tratadas com  $Na^+$  foi de 171 e 149  $mg\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ , respectivamente, não apresentando diferença significativa (Fig. 4.8A). Nas plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$ , o tratamento salino reduziu o  $J_V$  para 43 e 27  $mg\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ , nessa ordem, não diferindo significativamente entre si. Nas plantas previamente privadas de  $K^+$  e não expostas ao  $Na^+$ , o fluxo de  $Na^+$  na seiva de xilema ( $J_{Na}$ ) foi de 0,22  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ , equivalente à metade daquele medido nas plantas supridas de  $K^+$  e não tratadas com  $Na^+$  (0,44  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ ) (Fig. 4.8B). A exposição ao NaCl 40 mM aumentou o  $J_{Na}$  nas plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$  para 1,82 e 0,87  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ , nessa ordem. Esse aumento foi de até sete vezes nas plantas previamente privadas de  $K^+$  e de somente uma vez naquelas supridas de  $K^+$ , em referência às respectivas plantas controle. O fluxo de  $K^+$  ( $J_K$ ) foi equivalente a 2,52  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$  nas plantas previamente privadas de  $K^+$  e não tratadas com  $Na^+$  e foi de 2,17  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$  nas plantas previamente supridas de  $K^+$  e não expostas ao  $Na^+$ , diferindo significativamente (Fig. 4.8C). Nas plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$ , o tratamento salino diminuiu o  $J_K$  para 0,82 e 0,53  $\mu mol\ g^{-1}\ MF\ h^{-1}$ ,

respectivamente, apresentando diferença significativa entre si. Essa diminuição foi de 67% nas plantas previamente privadas de  $K^+$  e de 75% naquelas supridas de  $K^+$ , em comparação com as respectivas plantas não tratadas. Embora a privação de  $K^+$  tenha acarretado um maior  $J_{Na}$  sob tratamento salino, ela também propiciou um maior  $J_K$  se comparada à condição de suprimento desse nutriente.

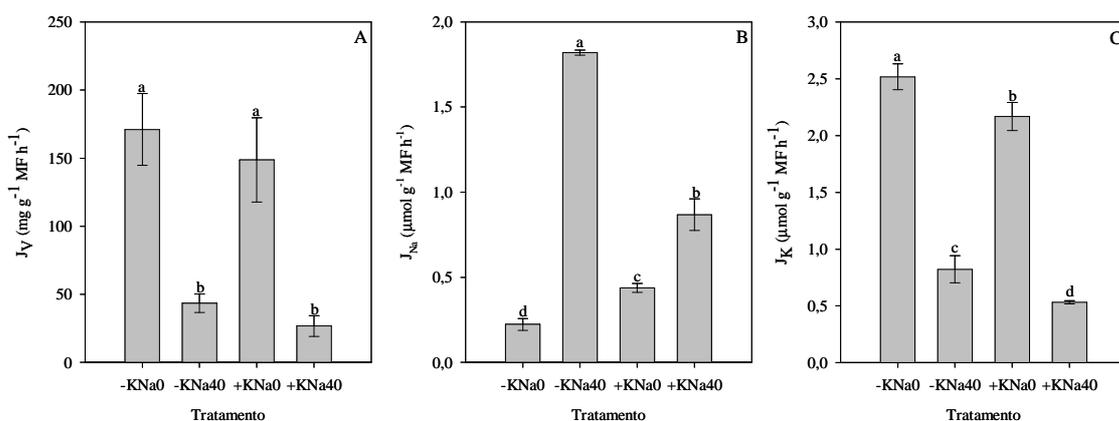


Figura 4.8 – Efeito da privação de  $K^+$  seguida da exposição ao  $Na^+$  sobre o fluxo de seiva (A) e o fluxo de  $Na^+$  (B) e  $K^+$  (C) no xilema em plantas de feijão caupi. As barras representam as médias e as linhas verticais, os desvios padrões de quatro repetições. As barras assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

As plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$  e não expostas ao  $Na^+$  apresentaram conteúdo de  $Na^+$  similar nas raízes e folhas novas, mas o conteúdo desse íon foi significativamente menor nas folhas velhas de plantas previamente privadas de  $K^+$  em comparação com aquelas supridas de  $K^+$  (Tabela 4.1). A exposição ao NaCl 40 mM por 24 h aumentou o conteúdo de  $Na^+$  em todos os órgãos de plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$ , em relação aos respectivos controles, com exceção das folhas velhas em plantas supridas de  $K^+$ . O conteúdo de  $Na^+$  das raízes foi 4,5 e 5,5 vezes superior ao das folhas nas plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$  e expostas ao tratamento salino, nessa ordem.

Tabela 4.1 – Efeito da privação de  $K^+$  seguida da exposição ao  $Na^+$  sobre o conteúdo de  $Na^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Parte	Tratamento			
	-KNa0	-KNa40	+KNa0	+KNa40
Raiz	304,35c	1304,34b	369,56c	1753,62a
Folha velha	173,91b	289,85a	318,84a	304,35a
Folha nova	159,41b	318,84a	173,91b	289,85a

O conteúdo de  $K^+$  nas raízes, folhas velhas e folhas novas foi inferior nas plantas previamente privadas de  $K^+$  e não tratadas com  $Na^+$ , em comparação com aquelas supridas de  $K^+$  e não expostas ao  $Na^+$  (Tabela 4.2). O tratamento salino causou redução do conteúdo de  $K^+$  em 20 e 26% nas raízes das plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$ , em referência aos respectivos controles. As folhas velhas e novas das plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$  não apresentaram alterações significativas no conteúdo de  $K^+$  devido a exposição ao  $NaCl$ , em relação às respectivas plantas não expostas.

Tabela 4.2 – Efeito da privação de  $K^+$  seguida da exposição ao  $Na^+$  sobre o conteúdo de  $K^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Parte	Tratamento			
	-KNa0	-KNa40	+KNa0	+KNa40
Raiz	1170,94c	940,17d	1965,81a	1470,08b
Folha velha	923,08b	880,34b	1572,65a	1504,27a
Folha nova	846,15b	829,05b	1000,00a	991,45a

Nas plantas não tratadas com  $Na^+$ , a relação  $K^+/Na^+$  nas raízes e folhas novas foi significativamente menor nas plantas previamente privadas de  $K^+$  e foi significativamente maior nas folhas velhas dessas plantas em comparação com as supridas de  $K^+$  (Tabela 4.3). O tratamento salino ocasionou a diminuição dessa relação em todos os órgãos das plantas previamente privadas e supridas de  $K^+$ , com exceção das folhas velhas de plantas supridas.

Tabela 4.3 – Efeito da privação de  $K^+$  seguida da exposição ao  $Na^+$  sobre a relação  $K^+/Na^+$  nas raízes, folhas velhas e folhas novas de plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Parte	Tratamento			
	-KNa0	-KNa40	+KNa0	+KNa40
Raiz	3,84b	0,72c	5,32a	0,84c
Folha velha	5,31a	3,05c	4,64b	4,94ab
Folha nova	4,87b	2,61d	5,75a	3,44c

#### 4.3.7 A privação de $K^+$ aumenta proporcionalmente a acumulação de $Na^+$ nas plantas de feijão caupi sob tratamento salino

As plantas privadas de  $K^+$  e não expostas ao  $Na^+$  apresentaram conteúdo de  $Na^+$  inferior ao das plantas supridas de  $K^+$  e não tratadas com  $Na^+$  apenas nas raízes, nas folhas velhas e no pecíolo das folhas novas (Tabela 4.4). Nas plantas privadas e supridas de  $K^+$ , o tratamento com NaCl 40 mM por três dias causou o aumento do conteúdo desse íon em todas as partes. No entanto, ocorreu maior acumulação de  $Na^+$  nas raízes, no caule e no pecíolo das folhas novas que nas folhas velhas e no limbo das folhas novas. O conteúdo de  $Na^+$  no caule e no limbo das folhas novas foi superior nas plantas privadas de  $K^+$  e tratadas com  $Na^+$  em comparação com as plantas supridas de  $K^+$  e expostas ao  $Na^+$ . Além disso, o aumento do conteúdo de  $Na^+$  em todas as partes das plantas sob tratamento salino foi proporcionalmente superior nas plantas privadas de  $K^+$  que nas plantas supridas de  $K^+$ , em relação às respectivas plantas não tratadas. Nas plantas privadas de  $K^+$  e tratadas com NaCl 40 mM, ocorreu um aumento de 5, 8, 4, 12 e 24 vezes no conteúdo de  $Na^+$  nas raízes, no caule, nas folhas velhas, no limbo e no pecíolo de folhas novas, respectivamente, em relação às plantas não tratadas. Em comparação, plantas supridas de  $K^+$  e expostas ao tratamento salino apresentaram um aumento de 3, 7, 2, 6 e 10 vezes no conteúdo de  $Na^+$  nas raízes, no caule, nas folhas velhas, no limbo e no pecíolo de folhas novas, respectivamente, em referência às plantas não expostas.

Tabela 4.4 – Efeito da privação de  $K^+$  e da exposição ao  $Na^+$  sobre o conteúdo de  $Na^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) em raízes, caule, folhas velhas e limbos e pecíolos das folhas novas em plantas de feijão caupi. As plantas foram crescidas em solução nutritiva completa (Hoagland e Arnon, 1950) por três dias em casa de vegetação. Em seguida, essas plantas foram pré-tratadas com solução modificada sem KCl ou com KCl 1 mM (conforme Material e Métodos) e mantidas mais quatro dias em casa de vegetação. As plantas pré-tratadas sem KCl foram expostas à solução modificada sem KCl e sem NaCl (K0Na0) ou sem KCl e com NaCl 40 mM (K0Na40); as plantas pré-tratadas com KCl 1 mM foram tratadas com KCl 1 mM e sem NaCl (K1Na0) ou com KCl 1 mM e NaCl 40 mM (K1Na40). Após três dias, as plantas foram coletadas. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Parte	Tratamento			
	K0Na0	K0Na40	K1Na0	K1Na40
Raiz	304,35c	1608,69a	434,78b	1536,23a
Caule	202,89c	1797,10a	217,39c	1521,74b
Folha velha	115,94c	449,27a	231,88b	405,79a
Folha nova - limbo	69,56c	840,58a	101,45c	594,20b
Folha nova - pecíolo	63,77c	1565,22a	142,03b	1521,73a

Nas plantas privadas de  $K^+$ , tratadas ou não com  $Na^+$ , o conteúdo de  $K^+$  em todas as partes foi inferior ao encontrado nas plantas supridas de  $K^+$ , expostas ou não ao  $Na^+$  (Tabela 4.5). Porém, a exposição ao NaCl 40 mM por três dias causou redução no conteúdo de  $K^+$  nas raízes, no caule e no pecíolo das folhas novas tanto nas plantas privadas quanto nas supridas de  $K^+$ , em relação às respectivas plantas não expostas. Adicionalmente, o tratamento salino aumentou o conteúdo de  $K^+$  nas folhas velhas e no limbo das folhas novas nas plantas privadas de  $K^+$ , mas não alterou o conteúdo de  $K^+$  nessas mesmas partes nas plantas supridas de  $K^+$ , em comparação com as respectivas plantas não tratadas. Nas raízes e no caule das plantas privadas de  $K^+$  e expostas ao  $Na^+$ , houve diminuição de até 23 e 53% no conteúdo de  $K^+$ , respectivamente, em relação às plantas não expostas. Em comparação, o conteúdo de  $K^+$  nas raízes e no caule das plantas supridas de  $K^+$  sob tratamento salino diminuiu apenas 12 e 41%, respectivamente, em referência às plantas não tratadas.

Tabela 4.5 – Efeito da privação de  $K^+$  e da exposição ao  $Na^+$  sobre o conteúdo de  $K^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) em raízes, caule, folhas velhas e limbos e pecíolos das folhas novas em plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Parte	Tratamento			
	K0Na0	K0Na40	K1Na0	K1Na40
Raiz	367,52c	282,05d	1085,47a	961,54b
Caule	474,36c	222,22d	1294,87a	769,23b
Folha velha	529,91c	658,12b	1495,72a	1547,00a
Folha nova - limbo	452,99c	538,46b	1166,67a	1170,94a
Folha nova - pecíolo	410,26c	346,15d	1576,92a	1320,51b

As plantas privadas de  $K^+$  e não tratadas com  $Na^+$  apresentaram relação  $K^+/Na^+$  inferior àquela verificada para as plantas supridas de  $K^+$  e não expostas ao  $Na^+$  em todas as partes (Tabela 4.6). O tratamento salino ocasionou a diminuição da relação  $K^+/Na^+$  em todas as partes das plantas privadas ou supridas de  $K^+$ , em comparação com as respectivas plantas não tratadas. Apesar disso, as plantas privadas de  $K^+$  e expostas ao NaCl 40 mM demonstraram uma relação  $K^+/Na^+$  inferior àquela constatada nas plantas supridas de  $K^+$  sob tratamento salino em todas as partes. Nas plantas expostas ao  $Na^+$ , privadas ou supridas de  $K^+$ , as menores relações  $K^+/Na^+$  foram verificadas nas raízes, no caule e no pecíolo das folhas novas.

Tabela 4.6 – Efeito da privação de  $K^+$  e da exposição ao  $Na^+$  sobre a relação  $K^+/Na^+$  em raízes, caule, folhas velhas e limbos e pecíolos das folhas novas em plantas de feijão caupi. Os valores representam médias de quatro repetições. Os valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Parte	Tratamento			
	KONa0	KONa40	K1Na0	K1Na40
Raiz	1,20b	0,17d	2,30a	0,62c
Caule	2,36b	0,12d	5,96a	0,51c
Folha velha	4,22b	1,47c	6,14a	3,82b
Folha nova - limbo	6,08b	0,64d	11,52a	1,98c
Folha nova - pecíolo	6,46b	0,22d	11,11a	0,87c

## 4.4 DISCUSSÃO

### 4.4.1 Caracterização fisiológica da absorção de $K^+$ por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi

No presente trabalho, a absorção de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade é caracterizada fisiologicamente nas raízes de feijão caupi, verificando-se a interferência de  $Na^+$  sobre as diferentes vias para a aquisição de  $K^+$  em concentrações micromolares. Os resultados referentes ao efeito do tempo de incubação mostram que as raízes de feijão caupi privadas de  $K^+$  por 96 h são capazes de captar esse nutriente a partir do meio externo em concentrações abaixo de 10  $\mu M$ . Resultados similares são obtidos para as raízes de cevada (SANTA-MARÍA *et al.*, 2000), arroz (BAÑUELOS *et al.*, 2002), pimenta (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005) e tomate (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007), indicando claramente que os mecanismos de alta afinidade para a

absorção de  $K^+$  são induzidos sob baixa disponibilidade desse nutriente no meio externo. A indução desses mecanismos coincide com a expressão dos transportadores pertencentes à família KT/HAK/KUP nas raízes dessas espécies, incluindo HAK1 (BAÑUELOS *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005; SANTA-MARÍA *et al.*, 2000) e HAK5 (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007; RUBIO *et al.*, 2000), sugerindo que esses transportadores devem mediar a absorção de  $K^+$  por mecanismos de alta afinidade. No entanto, transportadores da família HKT, como HKT1 (WANG *et al.*, 1998) e HKT2 (HORIE *et al.*, 2001), também são expressos nas raízes sob privação de  $K^+$ , podendo apresentar algum papel na captação de  $K^+$  da solução externa em concentrações micromolares.

Os resultados referentes ao efeito da dose de  $K^+$  demonstram que as raízes de feijão caupi privadas de  $K^+$  apresentam mecanismos para a absorção de alta afinidade com cinética de saturação característica. Esse padrão cinético se enquadra àqueles previamente estabelecidos para as raízes de cevada (EPSTEIN *et al.*, 1963), milho (KOCHIAN; LUCAS, 1982) e *Arabidopsis thaliana* (MAATHUIS; SANDERS, 1994), descritos segundo o modelo clássico de Michaelis-Menten. O valor de  $V_{máx}$  estimado para as raízes de feijão caupi em  $1,39 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$  se aproxima daquele encontrado para as raízes de pimenta, equivalente a  $1,72 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$  (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005), mas é inferior ao verificado para as raízes de arroz, igual a  $3,2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$  (BAÑUELOS *et al.*, 2002). Além disso, o valor de  $K_m$  estimado em  $65 \mu\text{M}$  para as raízes de feijão caupi, é superior ao verificado para as raízes de outras espécies, como *A. thaliana* (MAATHUIS; SANDERS, 1994), arroz (BAÑUELOS *et al.*, 2002) e pimenta (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005), calculado em 19, 14 e  $6 \mu\text{M}$ , respectivamente. Essas diferenças podem envolver a metodologia utilizada para a obtenção dos resultados. O cálculo da  $K_m$  para as raízes de *A. thaliana* está baseado no efeito da concentração externa de  $K^+$  sobre a despolarização da membrana em células epidérmicas (MAATHUIS; SANDERS, 1994). Além disso, o cálculo da  $K_m$  para as raízes de arroz (BAÑUELOS *et al.*, 2002) e pimenta (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005), é realizado a partir da integração das curvas de depleção. Alternativamente, as raízes de feijão caupi podem apresentar mecanismos para absorção de  $K^+$  em concentrações micromolares com menor afinidade que aqueles induzidos em outras espécies.

#### 4.4.2 A via sensível ao $\text{NH}_4^+$ deve depender dos HAKs e HKTs

O influxo líquido de  $\text{K}^+$  sofre forte inibição pelo  $\text{NH}_4^+$  nas raízes de feijão caupi, mostrando que a absorção por mecanismos de alta afinidade é mediada por uma via sensível e uma via insensível ao  $\text{NH}_4^+$ . A via sensível ao  $\text{NH}_4^+$  é majoritária, podendo perfazer até 90% da captação de  $\text{K}^+$  sob concentrações micromolares. Nas raízes de pimenta (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005) e tomate (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007), essa via também exerce papel central na absorção de  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta afinidade. O efeito inibitório do  $\text{NH}_4^+$  sobre o influxo líquido de  $\text{K}^+$  nas raízes de feijão caupi indica o envolvimento dos HAKs e HKTs na via sensível ao  $\text{NH}_4^+$ . A expressão de HAK1 nas raízes de arroz (BAÑUELOS *et al.*, 2002) e pimenta (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005) e HAK5 nas raízes de tomate (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007) sob privação de  $\text{K}^+$  coincide com a indução de uma via sensível ao  $\text{NH}_4^+$  que medeia a absorção de  $\text{K}^+$  sob baixa disponibilidade desse nutriente. Além disso, experimentos de expressão heteróloga de HAK1 e HKT1 de cevada (SANTA-MARÍA *et al.*, 2000) e HKT1 de *Eucalyptus camaldulensis* (FAIRBAIRN *et al.*, 2000) em leveduras e *Escherichia coli* deficientes em transportadores de  $\text{K}^+$ , respectivamente, indicam que o  $\text{NH}_4^+$  externo restringe fortemente a captação de  $\text{K}^+$  por essas células.

#### 4.4.3 Os canais de $\text{K}^+$ devem mediar a via insensível ao $\text{NH}_4^+$

A inibição farmacológica do influxo líquido de  $\text{K}^+$  nas raízes de feijão caupi demonstra que os canais de  $\text{K}^+$  contribuem minoritariamente para a absorção de  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta afinidade. De fato, os tratamentos com  $\text{Cs}^+$  0,1 mM e  $\text{Ba}^{2+}$  1 mM inibem o influxo líquido de  $\text{K}^+$  em apenas 20%. Inesperadamente, tratamentos com  $\text{TEA}^+$  não apresentam efeito inibitório. De acordo com esses resultados, os canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao  $\text{Cs}^+$  e ao  $\text{Ba}^{2+}$ , mas insensíveis ao  $\text{TEA}^+$  também medeiam a captação de  $\text{K}^+$  sob concentrações micromolares nas raízes de feijão caupi. O  $\text{Cs}^+$  e o  $\text{Ba}^{2+}$  são bloqueadores eficazes dos KIRCs localizados no córtex radicular em milho (ROBERTS; TESTER, 1995) e nos pêlos radiculares em batata (ZIMMERMANN *et al.*, 1998), tomate (HARTJE *et al.*, 2000) e *A.thaliana* (IVASHIKINA *et al.*, 2001). Apesar disso, os tratamentos com  $\text{Cs}^+$  0,1 mM e  $\text{Ba}^{2+}$  1 mM também podem ter inibido os transportadores da família HKT nas raízes de feijão caupi, pois o HKT1 de trigo (GRASSMAN *et al.*, 1996) e o

HKT1 e o HKT2 de *E. camaldulensis* (LIU *et al.*, 2001) são sensíveis a esses inibidores farmacológicos. Ainda que os HKTs tenham sido inibidos pelo  $\text{Cs}^+$  e pelo  $\text{Ba}^{2+}$  nas raízes de feijão caupi, a presença de uma via insensível ao  $\text{NH}_4^+$  sob privação de  $\text{K}^+$  corrobora a participação dos canais de  $\text{K}^+$  na absorção desse nutriente por mecanismos de alta afinidade. Enquanto o HKT1 de cevada (SANTA-MARÍA *et al.*, 2000) e *E. camaldulensis* (FAIRBAIRN *et al.*, 2000) são intensamente inibidos pelo  $\text{NH}_4^+$ , o AKT1 de *A. thaliana* consiste em uma via insensível a esse cátion para a aquisição de  $\text{K}^+$  em concentrações micromolares (HIRSCH *et al.*, 1998; SPALDING *et al.*, 1999).

4.4.5 A estimulação da absorção de  $\text{K}^+$  pelo  $\text{Na}^+$  em concentrações micromolares indica a participação dos HKTs

Concentrações externas micromolares de  $\text{Na}^+$  promovem o influxo líquido de  $\text{K}^+$  nas raízes de feijão caupi, enquanto concentrações milimolares de  $\text{Na}^+$  apresentam o efeito inverso. A estimulação da absorção de  $\text{K}^+$  por concentrações baixas de  $\text{Na}^+$  corrobora a participação dos HKTs nesse mecanismo. O HKT1 de trigo (GRASSMAN *et al.*, 1996), o HKT1 e o HKT2 de *E. camaldulensis* (FAIRBAIRN *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2001) e o HKT2 de arroz (HORIE *et al.*, 2001) atuam como co-transportadores  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Em experimentos de expressão heteróloga em leveduras, a atividade desses transportadores é promovida por  $\text{Na}^+$  1 mM. Ainda, concentrações de  $\text{Na}^+$  acima de 1 mM inibem o influxo líquido de  $\text{K}^+$  nas raízes de feijão caupi, sugerindo o efeito competitivo de  $\text{Na}^+$  sobre a absorção de  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta afinidade. Efeito semelhante é verificado em raízes de cevada (EPSTEIN *et al.*, 1963), arroz (BAÑUELOS *et al.*, 2002), pimenta (MARTÍNEZ-CORDERO *et al.*, 2005) e tomate (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007) sob baixa disponibilidade de  $\text{K}^+$ .

4.4.6 O  $\text{Na}^+$  pode exercer efeito inibitório sobre a via sensível e a via insensível ao  $\text{NH}_4^+$

O efeito interativo do  $\text{Na}^+$  com os diversos inibidores farmacológicos sobre o influxo líquido de  $\text{K}^+$  nas raízes de feijão caupi revela que o  $\text{Na}^+$  pode afetar tanto a via sensível quanto a via insensível ao  $\text{NH}_4^+$ . Realmente, os tratamentos com  $\text{NH}_4^+$  0,25 mM ou  $\text{Cs}^+$  0,1 mM adicionados de  $\text{Na}^+$  10 mM reduzem mais o influxo líquido de  $\text{K}^+$  que os tratamentos isolados

com  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$  ou  $\text{Na}^+$ .  $\text{Cs}^+$  0,1 mM é a concentração que gera a inibição máxima desse bloqueador sobre o influxo líquido de  $\text{K}^+$ . Assim, a adição de  $\text{Na}^+$  10 mM deve apresentar efeito inibidor sobre os transportadores envolvidos na via sensível ao  $\text{NH}_4^+$ . Complementarmente,  $\text{NH}_4^+$  0,25 mM é o tratamento que garante forte inibição do influxo líquido de  $\text{K}^+$ , de modo que a suplementação com  $\text{Na}^+$  10 mM pode ocasionar a inibição dos transportadores que medeiam a via insensível ao  $\text{NH}_4^+$ . Em raízes de tomate sob privação de  $\text{K}^+$ , a adição de  $\text{Na}^+$  ao meio de crescimento bloqueia parcialmente a via sensível ao  $\text{NH}_4^+$ , mas parece afetar pouco a via insensível (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2007). Essas evidências indicam que experimentos adicionais são necessários para confirmar o efeito inibitório de  $\text{Na}^+$  sobre as diferentes vias que medeiam a absorção de  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi.

#### 4.4.7 Modelo proposto para a absorção de $\text{K}^+$ por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem a proposição de um modelo integrativo das vias que propiciam a absorção de  $\text{K}^+$  por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi (Fig. 4.9). Segundo esse modelo, a entrada de  $\text{K}^+$  no simplasto radicular em condições de escassez desse nutriente pode ser mediada pelos canais de  $\text{K}^+$  sensíveis as  $\text{Cs}^+$  e ao  $\text{Ba}^{2+}$ , mas insensíveis ao  $\text{TEA}^+$  e ao  $\text{NH}_4^+$ . Adicionalmente, a via sensível ao  $\text{NH}_4^+$  deve envolver a participação dos transportadores das famílias KT/HAK/KUP e HKT. Os HAKs devem ser os principais componentes dessa via, enquanto os HKTs devem exercer papel secundário. Possivelmente, concentrações milimolares de  $\text{Na}^+$  apresentam efeito inibitório sobre os transportadores que medeiam essas diferentes vias. Esse estudo corrobora a existência de sistemas múltiplos para a aquisição de  $\text{K}^+$  pelas plantas, especialmente sob condições de escassez desse nutriente (KIM *et al.*, 1998; SANTA-MARÍA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 1998). A redundância desses sistemas para a execução da mesma função biológica deve possibilitar às plantas maior habilidade para lidar com variações na disponibilidade de nutrientes em diferentes condições ambientais, auxiliando na superação de estresses nutricionais (LEIGH; SZE, 2001).

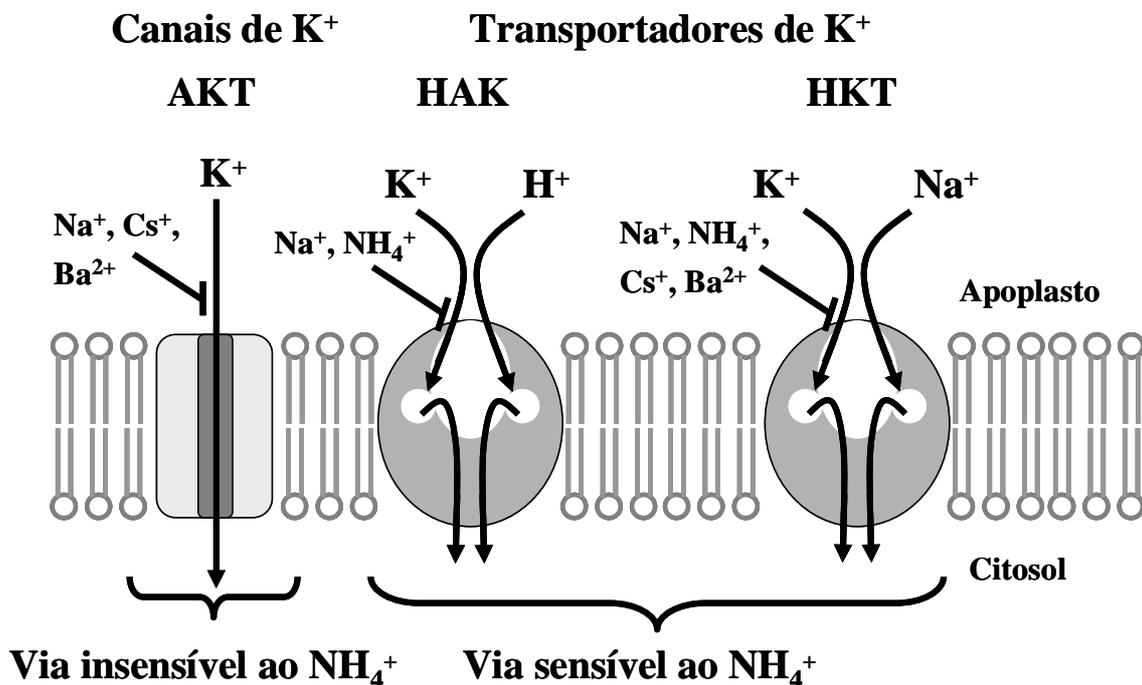


Figura 4.9 – Modelo proposto para as vias de absorção de K<sup>+</sup> por mecanismos de alta afinidade nas raízes de feijão caupi. A via sensível ao NH<sub>4</sub><sup>+</sup> deve ser mediada pelos transportadores de K<sup>+</sup> das famílias KT/HAK/KUP e HKT, enquanto a via insensível ao NH<sub>4</sub><sup>+</sup> envolve principalmente os canais de K<sup>+</sup> bloqueados pelo Cs<sup>+</sup> e pelo Ba<sup>2+</sup>. Em todos os transportadores, Na<sup>+</sup> pode exercer efeito competitivo sobre o transporte de K<sup>+</sup>.

#### 4.4.8 A privação de K<sup>+</sup> seguida pelo estresse salino reduz a capacidade apresentada pelas plantas de feijão caupi para compensar a entrada de Na<sup>+</sup> no xilema pelo carregamento aumentado de K<sup>+</sup>

A concentração de Na<sup>+</sup> na seiva de xilema ( $[\text{Na}^+]_{\text{xil}}$ ) nas plantas de feijão caupi submetidas ao tratamento salino por 24 h se aproxima da concentração externa de Na<sup>+</sup> ( $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ ). Essa evidência indica fortemente que o acesso do Na<sup>+</sup> ao xilema radicular nessa espécie é quase irrestrito. Outras dicotiledôneas também apresentam baixa capacidade para excluir o Na<sup>+</sup> da seiva, incluindo *Lupinus albus* (JESCHKE *et al.*, 1986), soja (DURAND; LACAN 1994) e pimenta (BLOM-ZANDSTRA *et al.*, 1998). Além disso, a exposição prévia das plantas de feijão caupi à privação de K<sup>+</sup> por 96 h não acarretou o aumento da  $[\text{Na}^+]_{\text{xil}}$ , sugerindo que os mecanismos envolvidos no carregamento de Na<sup>+</sup> na seiva não são estimulados pela baixa disponibilidade de K<sup>+</sup>. Complementarmente, a concentração de K<sup>+</sup> na seiva de xilema ( $[\text{K}^+]_{\text{xil}}$ ) nas plantas de feijão caupi é aumentada pelo tratamento salino, evidenciando que os mecanismos associados à liberação de K<sup>+</sup> na seiva são promovidos pelo aumento da  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ . Novamente,

outras dicotiledôneas demonstram resposta similar, pois a  $[K^+]_{xil}$  sofre acréscimo nas plantas de *L. albus* (JESCHKE *et al.*, 1986), soja (DURAND; LACAN 1994) e feijão comum (CABOT *et al.*, 2005) tratadas com NaCl. Entretanto, a aplicação combinada do estresse salino e da privação de  $K^+$  reduz a capacidade apresentada pelas plantas de feijão caupi para contrabalançar o incremento da  $[Na^+]_{xil}$  pelo carregamento aumentado de  $K^+$ . Como consequência do descompasso entre a liberação de  $Na^+$  e a de  $K^+$  no xilema sob tratamento salino, a relação  $K^+/Na^+$  na seiva assume valores inferiores a 1. Isso indica que a habilidade para manter maior carregamento de  $K^+$  em detrimento do  $Na^+$  é colapsado pela exposição das plantas de feijão ao NaCl 40 mM. Nas plantas de *L. albus* (JESCHKE *et al.*, 1986) e soja (DURAND; LACAN 1994), a exposição à mesma dose de NaCl também torna a  $[Na^+]_{xil}$  superior à  $[K^+]_{xil}$ . Porém, um efeito similar é alcançado com NaCl 75 mM nas plantas de feijão comum (CABOT *et al.*, 2005). A exposição prévia à privação de  $K^+$  não agrava o efeito do tratamento salino sobre a relação  $K^+/Na^+$  na seiva nas plantas feijão caupi.

O tratamento com NaCl 40 mM por apenas 24 h reduz similarmente o fluxo de seiva ( $J_V$ ) nas plantas de feijão caupi previamente privadas ou supridas de  $K^+$ . Assim como em feijão caupi, as plantas de pimenta não apresentam redução do  $J_V$  sob privação de  $K^+$ , mas demonstram uma diminuição acentuada do  $J_V$  sob estresse salino (CABAÑERO; CARVAJAL, 2007). Em comparação, o  $J_V$  é maior nas plantas de girassol expostas simultaneamente à privação de  $K^+$  e ao NaCl que nas plantas tratadas apenas com NaCl, especialmente sob temperatura elevada (QUINTERO *et al.*, 2007). Desse modo, a susceptibilidade das plantas de girassol ao estresse salino pode ser exacerbada em climas quentes devido ao aumento do  $J_V$  sob baixa disponibilidade de  $K^+$ , possibilitando um maior arraste dos íons tóxicos para a parte aérea através da corrente transpiratória. Em feijão caupi, no entanto, a privação de  $K^+$  não acarreta o incremento do  $J_V$  sob condições de salinidade elevada.

O aumento do fluxo de  $Na^+$  no xilema ( $J_{Na}$ ) e a diminuição do fluxo de  $K^+$  no xilema ( $J_K$ ), causados pelo tratamento com NaCl 40 mM nas plantas de feijão caupi, são exacerbados pelo pré-tratamento de privação de  $K^+$ . Nas plantas de pimenta expostas ao NaCl 10 mM, o incremento do  $J_{Na}$  é igualmente acompanhado pela redução do  $J_K$ , ao passo que o  $J_{Na}$  não é alterado na ausência de  $K^+$ , mas o  $J_K$  é diminuído (CABAÑERO; CARVAJAL, 2007). Embora a  $[Na^+]_{xil}$  e a  $[K^+]_{xil}$  sejam utilizadas para estimar a capacidade apresentada pelas plantas para excluir  $Na^+$  e manter o aporte de  $K^+$  nas folhas sob estresse salino (DURAND; LACAN 1994;

WATSON *et al.*, 2001), o  $J_{Na}$  e o  $J_K$  devem ser parâmetros mais precisos, porque indicam efetivamente a transferência desses íons das raízes para a parte aérea. Assim sendo, o feijão caupi apresenta baixa capacidade para evitar o envio de  $Na^+$  e sustentar o suprimento de  $K^+$  para as folhas quando as plantas são expostas ao NaCl 40 mM, especialmente sob baixa disponibilidade de  $K^+$ .

A exposição prévia à privação de  $K^+$  altera a acumulação de  $Na^+$  e  $K^+$  nos diferentes órgãos das plantas de feijão caupi sob estresse salino em curto prazo. De fato, as plantas previamente privadas de  $K^+$  e expostas ao NaCl 40 mM apresentam um maior conteúdo de  $Na^+$  nas raízes e menor conteúdo de  $K^+$  nas folhas velhas e novas que aquelas submetidas apenas ao tratamento salino. Além disso, a relação  $K^+/Na^+$  nas folhas velhas e novas alcança valores maiores sob salinidade elevada quando as plantas são previamente supridas de  $K^+$ . Considerando que o aumento do conteúdo de  $Na^+$  associado à diminuição do conteúdo de  $K^+$  pode propiciar a toxicidade de  $Na^+$  nos tecidos (MAATHUIS; AMTMANN, 1999), a privação de  $K^+$  tende a agravar esse efeito do estresse salino nas plantas de feijão caupi. Mais amplamente, os resultados encontrados para a  $[K^+]_{xil}$ , o  $J_{Na}$ , o  $J_K$  e a distribuição de  $Na^+$  e  $K^+$  pelos diferentes órgãos, indicam que a privação de  $K^+$  aliada ao estresse salino proporciona condições menos favoráveis à homeostase iônica nas plantas de feijão caupi que o estresse salino isolado.

#### 4.4.9 A privação de $K^+$ pode aumentar a exposição das plantas de feijão caupi à toxicidade de $Na^+$ sob estresse salino

Como esperado, o tratamento com NaCl 40 mM por três dias aumenta o conteúdo de  $Na^+$  em todas as partes das plantas de feijão caupi. No entanto, os conteúdos mais expressivos são encontrados nas raízes, no caule e no pecíolo, em comparação com o limbo das folhas velhas e novas. Em outras dicotiledôneas, incluindo *L. albus* (JESCHKE *et al.*, 1986), soja (DURAND; LACAN 1994), pimenta (BLOM-ZANDSTRA *et al.*, 1998), *A. thaliana* (SHI *et al.*, 2002), *Phaseolus* spp. (BAYUELO-JIMÉNEZ *et al.*, 2003) e feijão comum (CABOT *et al.*, 2005), o  $Na^+$  também é retido nas raízes, nos caules e nos pecíolos sob estresse salino. Essa distribuição não-uniforme de  $Na^+$  pelos diferentes órgãos têm sido vinculada aos mecanismos de resistência contra a toxicidade de  $Na^+$  nas espécies glicófitas (DURAND; LACAN, 1994; JESCHKE *et al.*, 1986; WOLF; JESCHKE, 1987). A retenção de  $Na^+$  nas partes basais ou mais velhas possibilita a

exclusão desse íon das folhas, protegendo os tecidos fotossintetizantes contra os danos metabólicos e fisiológicos decorrentes da acumulação do Na<sup>+</sup> no simplasto foliar (APSE; BLUMWALD, 2007; MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Além disso, a acumulação de Na<sup>+</sup> nas plantas de feijão caupi tratadas com NaCl é proporcionalmente aumentada sob a exposição simultânea à privação de K<sup>+</sup>. A aquisição de Na<sup>+</sup> pode apresentar efeitos benéficos sob baixa disponibilidade de K<sup>+</sup>, pela substituição parcial das funções biológicas executadas por esse nutriente, sobretudo a manutenção da pressão osmótica no vacúolo (MENGEL; KIRKBY, 2001). Em *Lycopersicon pennellii*, uma espécie selvagem de tomate, o crescimento na ausência de K<sup>+</sup> é estimulado por Na<sup>+</sup> 5 mM, demonstrando que baixas concentrações externas de Na<sup>+</sup> podem aliviar a deficiência de K<sup>+</sup> nessa espécie (TAHA *et al.*, 2000). Por outro lado, a absorção e a acumulação de Na<sup>+</sup> nas plantas de girassol é promovida pela privação de K<sup>+</sup>, especialmente sob temperaturas elevadas, sugerindo que essas plantas podem se tornar mais susceptíveis aos efeitos tóxicos de Na<sup>+</sup> devido à carência de K<sup>+</sup> (QUINTERO *et al.*, 2007). Considerando que a acumulação de Na<sup>+</sup> no limbo das folhas novas é favorecida pela privação de K<sup>+</sup> nas plantas de feijão caupi sob tratamento salino, a baixa disponibilidade desse nutriente deve aumentar a exposição dessa espécie à toxicidade de Na<sup>+</sup>.

Nas plantas de feijão caupi tratadas com NaCl 40 mM, o conteúdo de K<sup>+</sup> das raízes, do caule e do pecíolo é inferior ao encontrado no limbo das folhas velhas e novas. Esse padrão de distribuição de K<sup>+</sup> sob estresse salino é similar àquele apresentado para outras dicotiledôneas, como *L. albus* (JESCHKE *et al.*, 1986), soja (DURAND; LACAN, 1994), *Phaseolus* spp. (BAYUELO-JIMÉNEZ *et al.*, 2003; MISRA; DWIVEDI, 2004) e feijão comum (CABOT *et al.*, 2005). A resistência à toxicidade de Na<sup>+</sup> sob salinidade elevada não pode ser atribuída somente à exclusão do Na<sup>+</sup>, mas pode estar relacionada ainda à capacidade para manter ou aumentar o aporte de K<sup>+</sup> nas folhas. Nas plantas de feijão caupi tratadas apenas com NaCl 40 mM por três dias, o conteúdo de K<sup>+</sup> é mantido nas lâminas foliares, mas é reduzido nas raízes, no caule e no pecíolo, em comparação com o controle. Resultados similares são verificados para plantas de soja sob NaCl 50 mM por três dias (DURAND; LACAN, 1994). No entanto, nas plantas de feijão comum mantidas em NaCl 75 mM durante quatro dias, o conteúdo de K<sup>+</sup> nos limbos pode ser aumentado (CABOT *et al.*, 2005). Isto também é verificado nas plantas de feijão caupi sob tratamento salino, quando essas plantas são expostas simultaneamente à privação de K<sup>+</sup>. Dessa maneira, é possível que a recirculação de K<sup>+</sup> via floema contribua para a partição mais adequada

desse nutriente pelos diferentes órgãos sob salinidade elevada, principalmente quando a disponibilidade de  $K^+$  é um fator limitante (WOLF; JESCHKE, 1987; WOLF *et al.*, 1991).

A exclusão de  $Na^+$  associada à acumulação de  $K^+$  nas folhas em condições de estresse salino possibilita a manutenção da elevada relação  $K^+/Na^+$  nesses órgãos, a qual tem sido relacionada à resistência das espécies glicófitas contra a toxicidade de  $Na^+$  (ASHRAF; AHMAD, 2000; MISRA; DWIVEDI, 2004). Concentrações altas de  $K^+$  e baixas de  $Na^+$  no simplasto foliar são favoráveis à atividade das enzimas que dependem do  $K^+$  como cofator e que participam de processos metabólicos fundamentais, como a fotossíntese, a respiração e a síntese de proteínas (APSE; BLUMWALD, 2007; MAATHUIS; AMTMANN, 1999). As plantas de feijão caupi tratadas somente com NaCl 40 mM conseguem manter a relação  $K^+/Na^+$  foliar acima de 1, mas nas plantas submetidas conjuntamente ao tratamento salino e à privação de  $K^+$ , essa relação apresenta valor inferior a 1 no limbo das folhas novas. Novamente, a baixa disponibilidade de  $K^+$  predispõe as plantas de feijão caupi à toxicidade de  $Na^+$  sob estresse salino.

#### 4.4.9 Conclusão

As plantas de feijão caupi dispõem de sistemas múltiplos para a captação de  $K^+$  sob baixa disponibilidade, os quais são inibidos por concentrações externas de  $Na^+$  compatíveis com condições de salinidade. As plantas expostas à privação de  $K^+$  e ao NaCl apresentam maior fluxo de  $Na^+$  e menor fluxo de  $K^+$  no xilema, além de relação  $K^+/Na^+$  mais baixa nas folhas novas, que as plantas tratadas apenas com NaCl. Dessa maneira, a escassez de  $K^+$  e a salinidade elevada atuam como estresses sinérgicos para o estabelecimento de condições favoráveis a distúrbios da homeostase iônica nas plantas de feijão caupi.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

APSE, M.P.; BLUMWALD, E.  $Na^+$  transport in plants. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2247-2254, 2007.

ASHLEY, M.K.; GRANT, M.; GRABOV, A. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 425-436, 2006.

ASHRAF, M.; AHMAD, S. Influence of sodium chloride on ion accumulation, yield components and fibre characteristics in salt-tolerant and sal-sensitive lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Field Crops Research**, v. 66, p. 115-127, 2000.

BAÑUELOS, M.A.; GARCIADÉBLAS, B.; CUBERO, B.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. **Plant Physiology**, v. 130, p. 784-795, 2002.

BAYUELO-JIMÉNEZ, J.S.; DEBOUCK, D.G.; LYNCH, J.P. Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. **Field Crops Research**, v. 80, p. 207-222, 2003.

BLOM-ZANDSTRA, M.; VOGELZANG, S.A.; VEEN, B.W. Sodium fluxes in sweet pepper exposed to varying sodium concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1863-1868, 1998.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNIK, E. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

CABAÑERO, F.J.; CARVAJAL, M. Different cation stresses affect specially osmotic root hydraulic conductance, involving aquaporins, ATPase and xylem loading of ions in *Capsicum annuum*, L. plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1300-1310, 2007.

CABOT, C.; GARCÍA, M.C.; SIBOLE, J.V. Relation between xylem ion concentration and bean growth responses to short-term salinisation in spring and summer. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 327-334, 2005.

DAVENPORT, R.; JAMES, R.A.; ZAKRISSON-PLOGANDER, A.; TESTER, M.; MUNNS, R. Control of sodium transport in durum wheat. **Plant Physiology**, v. 137, p. 807-818, 2005.

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

DEMIDCHIK, V.; TESTER, M. Sodium fluxes through non-selective cation channels in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiology**, v. 128, p. 379-387, 2002.

DURAND, M.; LACAN, D. Sodium partitioning within the shoot of soybean. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 65-71, 1994.

EPSTEIN, E.; RAINS, D.W.; ELZAM, O.E. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 49, p. 684-692, 1963.

ESSAH, P.A.; DAVENPORT, R.; TESTER, M. Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 133, p. 307-318, 2003.

FAIRBAIRN, D.J.; LIU, W.; SCHACHTMAN, D.P.; GOMEZ-GALLEGO, S.; DAY, S.R.; TEASDALE, R.D. Characterization of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 515-525, 2000.

GARCIA, A.; RIZZO, C.A.; UD-DIN, J.; BARTOS, S.L.; SENADHIRA, D.; FLOWERS, T.J.; YEO, A.R. Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium: potassium selectivity differs between rice and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p. 1167-1174, 1997.

GAYMARD, F.; PILOT, G.; LACOMBE, B.; BOUCHEZ, D.; BRUNEAU, D.; BOUCHEREZ, J.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; THIBAUD, J.-B.; SENTENAC, H. Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. **Cell**, v. 94, p. 647-655, 1998.

GOLLDACK, D.; QUIGLEY, F.; MICHALOWSKI, C.B.; KAMASANI, U.R.; BOHNERT, H.J. Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 71-81, 2003.

GRASSMAN, W.; RUBIO, F.; SCHROEDER, J.I. Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. **The Plant Journal**, v. 10, p. 869-952, 1996.

HARTJE, S.; ZIMMERMANN, S.; KLONUS, D.; MÜLLER-RÖBER, B. Functional characterization of LKT1, a K<sup>+</sup> uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel SKT1 after expression in *Xenopus* oocytes. **Planta**, v. 210, p. 723-731, 2000.

HIRSCH, R.E.; LEWIS, B.D.; SPALDING, E.P.; SUSSMAN, M.R. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. **Science**, v. 280, p. 918-912, 1998.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-cultured method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station, circular n° 347, 1950.

HORIE, T.; YOSHIDA, K.; NAKAYAMA, H.; YAMADA, K.; OIKI, S.; SHINMYO, A. Two types of HKT transporters with different properties of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in *Oryza sativa*. **The Plant Journal**, v. 27, p. 129-138, 2001.

HUANG, Z.-Z.; YAN, X.; JALIL, A.; NORLYN, J.D.; EPSTEIN, E. Short-term experiments on ion transport by seedlings and excised roots. **Plant Physiology**, v. 100, p. 1914-1920, 1992.

HUANG, S.; SPIELMEYER, W.; LAGUDAH, E.S.; JAMES, R.A.; PLATTEN, J.D.; DENNIS, E.S.; MUNNS, R. A sodium transporter (HKT7) is a candidate for *Nax1*, a gene for salt tolerance in durum wheat. **Plant Physiology**, v. 142, p. 1718-1727, 2006.

IVASHIKINA, N.; BECKER, D.; ACHE, P.; MEYERHOFF, O.; FELLE, H.H.; HEDRICH, R. K<sup>+</sup> channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. **FEBS Letters**, v. 508, p. 463-469, 2001.

JAMES, R.A.; DAVENPORT, R.J.; MUNNS, R. Physiological characterization of two genes for Na<sup>+</sup> exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. **Plant Physiology**, v. 142, p. 1537-1547, 2006.

JESCHKE, W.D.; PATE, J.S.; ATKINS, C.A. Effects of NaCl salinity on growth, development, ion transport and ion storage in white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Ultra). **Journal of Plant Physiology**, v. 124, p. 257-274, 1986.

KIM, E.J.; KWAK, J.M.; UOZOMI, N.; SCHROEDER, J.I. *AtKUP1*: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. **The Plant Cell**, v. 10, p. 51-62, 1998.

KOCHIAN, L.V.; LUCAS, W.J. Potassium transport in corn roots. 1. Resolution of kinetics into a saturable and a linear component. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1723-1731, 1982.

LAGARDE, D.; BASSET, M.; LEPETIT, M.; CONEJERO, G.; GAYMARD, F.; ASTRUC, S.; GRIGNON, C. Tissue-specific expression of *Arabidopsis* *AKT1* gene is consistent with a role in K<sup>+</sup> nutrition. **The Plant Journal**, v. 9, p. 195-203, 1996.

LEIGH, R.A.; SZE, H. Membrane transport meets plant nutrition. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 47-48, 2001.

LIU, W.; FAIRBAIRN, D.J.; REID, R.J.; SCHACHTMAN, D.P. Characterization of two HKT1 homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capacity. **Plant Physiology**, v. 127, p. 283-294, 2001.

MAATHIUS, F.J.M.; AMTMANN, A. K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. **Annals of Botany**, v. 84, p. 123-133, 1999.

MAATHIUS, F.J.M.; SANDERS, D. Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 9272-9276, 1994.

MARTÍNEZ-CORDERO, M.A.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. High-affinity K<sup>+</sup> uptake in pepper plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1553-1562, 2005.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of Plant Nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001.

MISRA, N.; DWIVEDI, U.N. Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. **Plant Science**, v. 166, p. 1135-1142, 2004.

MITLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 1360-1385, 2006.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **The New Phytologist**, v.167, p. 645-663, 2005.

NIEVES-CORDONES, M.; MARTÍNEZ-CORDERO, M.A.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. An NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-sensitive component dominates high-affinity K<sup>+</sup> uptake in tomato plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 273-280, 2007.

QUINTERO, J.M.; FOURNIER, J.M.; BENLLOCH, M. Na<sup>+</sup> accumulation in shoot is related to water transport in K<sup>+</sup>-starved sunflower plants but not in plants with a normal K<sup>+</sup> status. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 60-67, 2007.

ROBERTS, S.K.; TESTER, M. Inward and outward K<sup>+</sup>-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize root cortex and stele. **The Plant Journal**, v. 8, p. 811-825, 1995.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Potassium transport in fungi and plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 1-30, 2000.

RUBIO, F.; FLORES, P.; NAVARRO, J.M.; MARTINEZ, V. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  and cGMP on  $\text{Na}^{+}$  uptake in pepper plants. **Plant Science**, v. 165, p. 1043-1049, 2003.

RUBIO, F.; SANTA-MARÍA, G.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Cloning of *Arabidopsis* and barley HAK potassium transporters in root and shoot cells. **Physiologia Plantarum**, v. 109, p. 34-43, 2000.

SANTA-MARÍA, G.E.; DANNA, C.H.; CZIBENER, C. High-affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and -insensitive pathways. **Plant Physiology**, v. 123, p. 297-306, 2000.

SANTA-MARÍA, G.E.; RUBIO, F.; DUBCOVSKY, J.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. **Plant Cell**, v. 9, p. 2281-2289, 1997.

SCHURR, U. Xylem sap sampling – new approaches to an old topic. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 293-298, 1998.

SHI, H.; QUINTERO, F.J.; PARDO, J.M.; ZHU, J.-K. The putative plasma membrane  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporter SOS1 controls long-distance  $\text{Na}^{+}$  transport in plants. **The Plant Cell**, v. 14, p. 465-477, 2002.

SPALDING, E.P.; HIRSCH, R.E.; LEWIS, D.R.; QI, Z.; SUSSMAN, M.R.; LEWIS, B.D. Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity. Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. **Journal of General Physiology**, v. 113, p. 909-918, 1999.

TAHA, R.; MILLS, D.; HEIMER, Y.; TAL, M. The relation between low  $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$  ratio and salt-tolerance in the wild tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 59-64, 2000.

UOZOMI, N.; KIM, E.J.; RUBIO, F.; YAMAGUCHI, T.; MUTO, S.; TSUBOI, A.; BAKKER, E.P.; NAKAMURA, T.; SCHROEDER, J.I. The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na<sup>+</sup> currents in *Xenopus leavis* oocytes and Na<sup>+</sup> uptake in *Sccharomyces cerevisiae*. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1249-1259, 2000.

WANG, T.-B.; GASSMANN, W.; RUBIO, F.; SCHROEDER, J.I.; GLASS, D.M. Rapid up-regulation of *HKT1*, a high-affinity transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. **Plant Physiology**, v. 118, p. 651-659, 1998.

WATSON, R.; PRITCHARD, J.; MALONE, M. Direct measurement of sodium and potassium in the transpiration stream of salt-excluding and non-excluding varieties of wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1873-1881, 2001.

WEGNER, L.H.; RASCHKE, K. Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots: a procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch-clamp exploration of salt passageways into xylem vessels. **Plant Physiology**, v. 105, p. 799-813, 1994.

WEGNER, L.H.; DE BOER, A.H. Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K<sup>+</sup> homeostasis and long-distance signaling. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1707-1719, 1997.

WOLF, O.; JESCHKE, W.D. Modeling of sodium and potassium flows via phloem and xylem in the shoot of salt-stressed barley. **Journal of Plant Physiology**, v. 128, p. 371-386, 1987.

WOLF, O.; MUNNS, R.; TONNET, M.L.; JESCHKE, W.D. The role of the stem in the partitioning of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in salt-treated barley. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 697-704, 1991.

YADAV, R.; FLOWERS, T.J.; YEO, A.R. The involvement of the transpirational bypass flow in sodium uptake by high- and low-sodium transporting lines of rice developed through intravarietal selection. **Plant, Cell and Environment**, v. 19, p. 329-336, 1996.

YEO, A.R.; YEO, E.M.; CAPORN, S.J.M.; LACHNO, D.R.; FLOWERS, T.J. The use of  $^{14}\text{C}$ -ethane diol as a quantitative tracer for the transpirational volume flow of water and an investigation of the effects of salinity upon transpiration, net sodium accumulation and endogenous ABA in individual leaves of *Oryza sativa* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, p. 1099-1109, 1985.

ZIMMERMANN, S.; TALKE<sup>1</sup>, I.; EHRHARDT, T.; NAST, G.; MÜLLER-RÖBER, B. Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. **Plant Physiology**, v. 116, p. 879-890, 1998.