

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ELTON CAMELO MARQUES

ESTRESSE SALINO E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS COTILEDONARES
DURANTE A GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA PLÂNTULA DE
CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE

FORTALEZA

2009

ELTON CAMELO MARQUES

**ESTRESSE SALINO E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS COTILEDONARES
DURANTE A GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA PLÂNTULA DE
CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: *Prof. Dr. Enéas Gomes Filho*

Co-orientador: *Prof. Dr. José Tarquinio Prisco*

FORTALEZA

2009

M316e Marques, Elton Camelo

Estresse salino e mobilização de reservas cotiledonares durante a germinação e estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce / Elton Camelo Marques, 2009.

118 f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

Co-orientador: Prof. Dr. José Tarquinio Prisco

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2009.

1. Amido 2. *Anacardium occidentale* 3. Lipídios 4. Proteínas 5. Salinidade
I. Gomes Filho, Enéas (orient.) II. Prisco, José Tarquinio (co-orient.) III.
Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Bioquímica IV. Título

CDD 574.192

ELTON CAMELO MARQUES

**ESTRESSE SALINO E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS COTILEDONARES
DURANTE A GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA PLÂNTULA DE
CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. José Tarquinio Prisco (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRBA

FORTALEZA

2009

*Ao meu pai, **Antonio**, à minha
mãe, **Maria**, e à minha amada,
Alexcyane.*

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a *Deus*, que durante toda a minha vida conduziu-me pelos caminhos por Ele traçados, fazendo-me chegar até aqui;

Aos meus pais, *Antonio Castro Marques e Maria Camelo Marques*, a quem dedico este trabalho, um agradecimento especial pela abnegação, apoio e compreensão despendidos comigo durante toda a minha vida;

Aos meus demais familiares, que sempre torceram para que eu alcançasse meus almejos;

À minha amiga e namorada *Alexcyane Rodrigues Feijão*, a quem dedico este trabalho, um agradecimento especial pelo apoio, carinho, compreensão e companheirismo dedicados a mim durante todos esses anos de convívio e que foram de extrema valia para a concretização desse trabalho;

Aos professores *Enéas Gomes Filho e José Tarquínio Prisco*, um agradecimento especial pela confiança depositada, orientação, apoio e incentivo durante esta etapa de minha formação acadêmica, sem, contudo, esquecer que foram os responsáveis pela minha iniciação científica;

Ao professor *André Dias de Azevedo Neto*, pelas críticas e sugestões a este trabalho e por aceitar participar de minha banca examinadora;

Aos graduandos em Ciências Biológicas, *Paulo André Ferreira de Freitas e Raimundo Wesley Mota de Melo Filho*, pela ajuda na etapa inicial de execução dos experimentos;

Aos demais amigos e colegas do grupo de Fisiologia Vegetal: *Alexandre Bosco de Oliveira, Carlos Eduardo Braga de Abreu, Franklin Aragão Gondim, Prof. Joaquim Enéas Filho, Juan Carlos Alvarez Pizarro, Júlio César Barbosa da Silva, Michella de Albuquerque Lima, Michelle Aparecida Freitas de Andrade, Nara Lídia Mendes Alencar, Tatiana Galdino Costa, Thalita Montoril Ferreira, Valdinéia Soares Freitas e Viviane Pinho de Oliveira*, que me ajudaram direta ou indiretamente no decorrer deste trabalho;

Aos amigos e colegas do curso de mestrado em Bioquímica, ingresso 2007.1, especialmente *Jefferson Soares de Oliveira e Eliane Silva Araújo*, que comigo

compartilharam diversos momentos, entre os quais, a alegria de sermos aprovados na seleção para o Doutorado em Bioquímica;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, especialmente àqueles de quem tive a oportunidade de ser aluno, pelas experiências e ensinamentos compartilhados comigo, bem como aos demais membros do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (estudantes e funcionários);

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado a mim concedida, bem como pelo auxílio financeiro às pesquisas do LABFIVE 1;

A todas as pessoas que de qualquer forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que não foram supracitadas, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

Este trabalho objetivou obter informações básicas sobre a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) anão-precoce em condições de salinidade e a relação entre salinidade e mobilização de reservas durante esses processos. As castanhas do clone BRS 189 foram semeadas em bandejas de plástico contendo vermiculita umedecida com água destilada (tratamento controle) ou soluções de NaCl com condutividades elétricas de 6,0, 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹ (tratamentos salinos), as quais foram mantidas em casa de vegetação. No decorrer do experimento, foram coletadas cinco plântulas por bandeja, à medida que estas alcançavam os estádios de desenvolvimento (ED) 2 (emersão da radícula), 4 (emergência do solo) e 8 (plântula estabelecida), as quais foram divididas nas suas partes constituintes (cotilédones e eixo embrionário), tendo-se o ED 0 (castanha quiescente) como referência. Avaliaram-se os efeitos da salinidade sobre as plântulas de cajueiro anão-precoce através de medidas da massa seca dos cotilédones e eixo embrionário e da quantificação dos teores de lipídios, proteínas totais e amido nos cotilédones e de carboidratos solúveis (reduzidos e não-reduzidos), aminoácidos livres e dos íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ nos cotilédones e eixo embrionário. Além disso, avaliou-se a atividade das principais enzimas envolvidas na mobilização de reservas lipídicas (lipase, liase do isocitrato e sintase do malato) e amiláceas (sintase do amido, α + β -amilase e fosforilase do amido) nos cotilédones de plântulas crescidas em condições controle e em 18,0 dS.m⁻¹. A maior taxa de depleção dos cotilédones ocorreu entre o ED 4 e o ED 8, simultaneamente à fase mais intensa de crescimento do eixo embrionário. Todavia, esses processos foram inibidos pela salinidade, principalmente nas plântulas crescidas a 18,0 dS.m⁻¹. A mobilização das reservas lipídicas e protéicas dos cotilédones tornou-se evidente após a emersão da radícula (ED 2), sendo mais pronunciada entre o ED 4 e o ED 8, porém, nessas plântulas, esse processo foi severamente inibido, na proporção em que a concentração de sais do meio aumentou. Nas plântulas do controle, houve um aumento nos teores de aminoácidos livres dos cotilédones entre o ED 0 e o ED 2, seguido por um decréscimo entre o ED 2 e o ED 8, mas o mesmo não aconteceu nas plântulas submetidas a 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹, em que ocorreu inibição do transporte dos aminoácidos para o eixo embrionário. Houve um acúmulo transiente de amido nos cotilédones durante o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce, que foi severamente inibido pela salinidade, especialmente nas plântulas crescidas a 18,0 dS.m⁻¹. Os teores de carboidratos solúveis nos cotilédones foram ditados pela sua utilização (fração não-reduzida) na etapa de germinação (entre o ED 0 a ED 2), pela sua produção a partir da mobilização lipídica (fração

não-redutora) e amilácea (fração redutora) e pelo seu transporte para o eixo embrionário (fração não-redutora). Entretanto, a salinidade afetou esses processos, causando redução nos teores de carboidratos redutores nas plântulas no ED 8 e inibindo o transporte dos carboidratos não-redutores para o eixo embrionário. Adicionalmente, os teores de aminoácidos livres e carboidratos solúveis do eixo embrionário também aumentaram ao longo do estabelecimento da plântula, mas este aumento foi severamente inibido pela salinidade, principalmente nas plântulas submetidas a 18,0 dS.m⁻¹. Os teores dos íons tóxicos (Na⁺ e Cl⁻) nos cotilédones e no eixo embrionário aumentaram consideravelmente com a salinidade, enquanto os de K⁺ foram reduzidos. Os maiores valores da atividade lipásica, assim como das enzimas liase do isocitrato, sintase do malato e (α+β)-amilase foram encontrados nos cotilédones das plântulas no ED 8, que correspondeu ao ED em que a mobilização lipídica e amilácea foi mais pronunciada, mas, dentre estas, apenas as atividades lipásica e amilásica foram inibidas pela salinidade. A sintase do amido, por sua vez, esteve mais ativa no ED 4, em concomitância à etapa de acúmulo do amido nos cotilédones, sendo fortemente inibida pela salinidade nesse mesmo ED. Já a atividade da fosforilase do amido decresceu progressivamente entre o ED 0 e o ED 4, mas aumentou entre o ED 4 e o ED 8. A análise em conjunto destes resultados permite concluir que a etapa de estabelecimento da plântula (entre o ED 2 e o ED 4) é mais sensível à salinidade do que a de germinação (entre o ED 0 e o ED 2). Além do mais, os efeitos iônicos da salinidade pareceram mediar a inibição da mobilização das reservas cotiledonares e a redução do dreno exercido pelo eixo embrionário sobre os cotilédones, resultando na redução do crescimento da plântula de cajueiro anão-precoce.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*, estabelecimento da plântula, germinação, mobilização de reservas, salinidade.

ABSTRACT

This study aimed to obtain basic information on seed germination and seedling establishment of dwarf-precocious cashew (*Anacardium occidentale* L.) under saline conditions and the relationship between salinity and reserve mobilization during these processes. BRS 189 seeds (cashew nuts) were sown in plastic trays containing vermiculite moistened with distilled water (control) or NaCl solutions with electrical conductivities of 6.0, 12.0 and 18.0 dS m⁻¹ (saline treatments), which were kept in a greenhouse. During the experiment, were harvested five seedlings (cotyledons and embryonic axis) per tray, when they reached the followed developmental stages (DS): quiescent seed (0 DS), radicle protrusion (2 DS), seedling emergence (4 DS) and seedling established (8 DS). Salinity effects on the dwarf-precocious cashew seedlings were evaluated by cotyledons and embryonic axis dry mass, determination of lipids, protein and starch contents in cotyledons and determination of soluble carbohydrates (reducing and non-reducing), free amino acids, Na⁺, K⁺ and Cl⁻ contents in cotyledons and embryonic axis. We also evaluated the enzymes involved in the lipid (lipase, isocitrate lyase and malate synthase) and starch (starch synthase, α + β -amylase and starch phosphorylase) mobilization in cotyledons of seedlings grown under control and 18.0 dS m⁻¹ conditions. In cotyledons, the highest depletion rate occurred between 4 and 8 DS, which corresponded the most intense growth phase of the embryonic axis. However, these processes were inhibited by salinity, especially in the seedlings grown at 18.0 dS m⁻¹. In cotyledons, lipid and protein mobilization became evident after the radicle protrusion (2 DS), being more pronounced between 4 and 8 DS. On the other hand, for these seedlings, this process was strongly inhibited, with the salt concentration increase. In control seedlings, there was an increase in free amino acids contents of cotyledons between 0 and 2 DS, followed by a decrease between 2 and 8 DS. It has not been observed in seedlings subjected to 12.0 and 18.0 dS m⁻¹, in which there was an inhibition of amino acids transport to the embryonic axis. In addition, a starch transient accumulation occurred in the cotyledons, during the dwarf-precocious cashew seedling establishment, which was strongly inhibited by salinity, especially in the seedlings grown at 18.0 dS m⁻¹. The soluble carbohydrates contents in cotyledons were influenced by their use (fraction of non-reductive) in the germination (between DS 0 and DS 2), their production from lipid (non-reducing fraction) and starch (reducing fraction) mobilization and their transport to the embryonic axis (non-reducing fraction). However, these processes were affected by salinity, causing a reduction in reducing carbohydrates contents in 8 DS seedlings and inhibiting the non-reducing carbohydrates

transport to embryonic axis. Additionally, the free amino acids and soluble carbohydrates contents also increased in embryonic axis during the seedling establishment, but this increase was strongly inhibited by salinity, especially in the seedlings subjected to 18.0 dS m⁻¹. The toxic ions (Na⁺ and Cl⁻) concentration in cotyledons and embryonic axis increased significantly with salinity, whereas K⁺ content was reduced. The highest lipase, isocitrate lyase, malate synthase and (α + β)-amylase activities were observed in cotyledons 8 DS seedlings, which corresponded to the DS with more intense lipid and starch mobilization, among these enzymes, only the lipase and amylase were inhibited by salinity. The starch synthase activity was most intense at 4 DS, simultaneously to the starch accumulation in the cotyledons, being strongly inhibited by salinity in this period. The starch phosphorylase activity decreased progressively between 0 DS and 4 DS, but increased between 4 DS and 8 DS. These results show that seedling establishment (between 2 DS and 4 DS) is more sensitive to salinity than seed germination (between DS 0 and DS 2). Moreover, the salinity ionic effect seems to mediate the cotyledonary reserve mobilization inhibition and it reduced embryonic axis sink on the cotyledons, which negatively affect dwarf-precocious cashew seedlings growth.

Keywords: *Anacardium occidentale*, lipid, protein, salinity, starch.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estádios de desenvolvimento da plântula de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) anão-precoce..... 46
- Figura 2.** Composição química dos cotilédones de sementes quiescentes do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce..... 60
- Figura 3.** Massa seca dos cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹)..... 61
- Figura 4.** Massa seca do eixo embrionário de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹)..... 62
- Figura 5.** Teores de lipídios totais de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹)..... 65
- Figura 6.** Teores de proteínas totais e de aminoácidos livres de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹)..... 67
- Figura 7.** Teores de aminoácidos livres no eixo embrionário de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹)..... 69
- Figura 8.** Teores de amido em cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹)..... 71
- Figura 9.** Teores de carboidratos solúveis, redutores e não-redutores em cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes

	estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m ⁻¹).....	74
Figura 10.	Teores de carboidratos solúveis, redutores e não-redutores no eixo embrionário de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m ⁻¹).....	78
Figura 11.	Teores dos íons Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻ em cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m ⁻¹).....	81
Figura 12.	Teores dos íons Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻ no eixo embrionário de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m ⁻¹).....	82
Figura 13.	Atividade total e específica da lipase proveniente de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 dS.m ⁻¹).....	84
Figura 14.	Atividade total e específica da liase do isocitrato proveniente de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 dS.m ⁻¹).....	87
Figura 15.	Atividade total e específica da sintase do malato proveniente de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 dS.m ⁻¹).....	88
Figura 16.	Atividade total e específica da sintase do amido proveniente de	

	cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 dS.m ⁻¹).....	90
Figura 17.	Atividade total e específica da fosforilase do amido proveniente de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 dS.m ⁻¹).....	93
Figura 18.	Atividade total e específica das (α+β)-amilases provenientes de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 dS.m ⁻¹).....	96

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Justificativa	15
1.2. Objetivos	17
1.2.1. Objetivo geral.....	17
1.2.2. Objetivos específicos.....	17
1.3. Revisão bibliográfica	18
1.3.1. Formação da semente.....	18
1.3.2. Germinação e estabelecimento da plântula.....	21
1.3.3. Mobilização de reservas.....	22
1.3.3.1. Lipídios.....	22
1.3.3.2. Proteínas.....	26
1.3.3.3. Amido e outros carboidratos.....	29
1.3.3.4. Controle da mobilização de reservas.....	34
1.3.4. Salinidade, germinação e estabelecimento da plântula.....	36
1.3.5. Cajueiro.....	40
1.3.5.1. Características morfológicas.....	40
1.3.5.2. Cajucultura, irrigação e salinidade.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Condições gerais de semeadura	44
2.2. Coleta do material vegetal	44
2.3. Determinação das substâncias orgânicas e inorgânicas em cotilédones e eixo embrionário	45
2.3.1. Lipídios.....	45
2.3.2. Proteínas totais.....	47
2.3.3. Carboidratos solúveis totais, redutores e não-redutores.....	48
2.3.4. Amido.....	49

2.3.5. Aminoácidos livres.....	50
2.3.6. Íons Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻	51
2.4. Atividades enzimáticas em cotilédones.....	52
2.4.1. Enzimas do metabolismo dos lipídios.....	52
2.4.1.1. Extração.....	52
2.4.1.2. Lipase (E.C. 3.1.1.3).....	52
2.4.1.3. Liase do isocitrato (E.C. 4.1.3.1).....	53
2.4.1.4. Sintase do malato (E.C. 2.3.3.9).....	54
2.4.2. Enzimas do metabolismo de amido.....	54
2.4.2.1. Extração.....	54
2.4.2.2. Sintase do amido (E.C. 2.4.1.21).....	55
2.4.2.3. (α+β)-Amilase (E.C. 3.2.1.1 e E.C. 3.2.1.2).....	56
2.4.2.4. Fosforilase do amido (E.C. 2.4.1.1).....	56
2.4.3. Concentração de proteína.....	57
2.5. Delineamento experimental e análise estatística.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4. CONCLUSÕES.....	98
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

A germinação consiste numa série de eventos que se inicia com a embebição de água pela semente e termina com a emergência da radícula ou de outra parte do embrião (BEWLEY; BLACK, 1994). Após a germinação, tem início uma etapa de intensa mobilização de reservas, que foram armazenadas no endosperma ou nos cotilédones durante o desenvolvimento e maturação da semente (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004b).

Há enorme variação na composição química das sementes, mas as substâncias armazenadas em maiores quantidades são os carboidratos, os lipídios e as proteínas (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a). Os principais compostos derivados dos carboidratos que atuam como reserva são os polissacarídeos de reserva da parede celular e o amido. Quanto às proteínas, quatro grandes grupos são encontrados em vários tipos de sementes: as albuminas, as globulinas, as prolaminas e as glutelinas. Já os lipídios de reserva são armazenados na forma de triacilgliceróis (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a).

As reservas das sementes têm, basicamente, duas funções: servir como fonte de energia e como fonte de esqueletos de carbono para a formação dos tecidos da plântula (BUCKERIDGE *et al.*, 2004b). Assim, o sucesso na germinação e no estabelecimento da plântula está diretamente relacionado com uma taxa eficiente de mobilização de reservas. Entretanto, outros fatores podem afetar esses processos, entre os quais destacam-se: quantidade e qualidade das reservas energéticas; morfologia funcional dos cotilédones; fatores abióticos (temperatura, disponibilidade de oxigênio e luz, excesso ou déficit hídrico, salinidade); e, finalmente, interações com outras espécies (MELO *et al.*, 2004).

A salinidade é um dos estresses abióticos que mais limita a produção agrícola, em razão de seus efeitos no crescimento e desenvolvimento vegetal, os quais podem ser de natureza iônica, osmótica ou de ambas (PRISCO, 1980; HASEGAWA *et al.*, 2000). Os efeitos iônicos resultam da elevada absorção de íons, especialmente Na^+ e Cl^- , que em altas concentrações, alteram a homeostase iônica, perturbando as funções fisiológicas e bioquímicas da célula (NIU *et al.*, 1995; HASEGAWA *et al.*, 2000; ZHU, 2003). Os efeitos osmóticos, decorrentes da redução do potencial osmótico do ambiente radicular e, conseqüentemente, do potencial hídrico, acarretam a diminuição da disponibilidade de água para a semente, plântula ou planta (GREENWAY; MUNNS, 1980; PRISCO, 1980).

A salinidade inibe a germinação e o estabelecimento da plântula, não apenas porque reduz o gradiente de potencial hídrico entre a semente e o solo, mas também porque altera o metabolismo de forma significativa, inibindo a mobilização das reservas e alterando o sistema de membranas do eixo embrionário. Sabe-se que, pelo menos em parte, isto se deve aos efeitos dos sais sobre a síntese ou ativação das enzimas envolvidas na mobilização das reservas da semente (PRISCO; O'LEARY, 1970; PRISCO, 1987). Em glicófitas, observa-se que a germinação é menos afetada pela salinidade do que a etapa de estabelecimento da plântula (PRISCO, 1987). Os efeitos da salinidade sobre a mobilização de proteínas (PRISCO; VIEIRA, 1976; GOMES-FILHO; PRISCO, 1978), amido (PRISCO *et al.*, 1981; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1998) e ácidos nucléicos (GOMES-FILHO *et al.*, 1983; GOMES-FILHO *et al.*, 2008) vêm sendo estudados desde a década de 70, contudo, poucos são os trabalhos que estudam tais efeitos sobre a mobilização de reservas lipídicas. Em jojoba, Kayani, Naqvi e Ting (1990) observaram uma inibição da mobilização de lipídios com o aumento da salinidade, acompanhada pelo acúmulo de carboidratos solúveis nos cotilédones, ao passo que Younis, Hasaneen e Nemet-Alla (1987) correlacionaram a redução na

percentagem de germinação de sementes de linho, algodão e mamona (ricas em reservas lipídicas) semeadas em condições crescentes de salinidade à inibição da atividade lipásica.

A cajucultura tem grande importância sócio-econômica, principalmente para a região Nordeste do Brasil. Com uma área plantada superior a 740 mil hectares, responde por 100% da produção nacional, sendo o estado do Ceará seu maior produtor, com 39% do total (OLIVEIRA, 2002; IBGE, 2008). No Brasil, sua importância social traduz-se pelo número de empregos diretos que gera, sendo 35 mil no campo e 15 mil na indústria, além de 250 mil empregos indiretos nos dois segmentos (OLIVEIRA, 2002). A amêndoa (que está contida na castanha) corresponde à semente propriamente dita e é composta principalmente por lipídios (46,1%), seguidos de carboidratos (22,5%) e proteínas (21,3%), mas essa proporção pode variar entre os tipos de cajueiro comum e anão-precoce (e nos seus diferentes clones) (MAIA; HOLANDA; MARTINS, 1971; SOUZA-FILHO *et al.*, 1989; BARROS, 1995). Mesmo com tamanha importância, poucos são os estudos relacionados com a germinação e estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce e com a mobilização de suas reservas. Além disso, o conhecimento sobre o modo como a salinidade afeta tais processos é limitado.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

O presente trabalho visou obter informações básicas sobre a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce sob condições de salinidade e a relação entre salinidade e mobilização de reservas durante esses processos.

1.2.2. Objetivos específicos

Utilizando-se como material experimental o clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce, avaliaram-se os efeitos da salinidade:

- na massa seca dos cotilédones e eixo embrionário, ao longo do desenvolvimento das plântulas;
- na mobilização das reservas cotiledonares de lipídios, proteínas, amido, assim como nos teores de carboidratos solúveis (reduzores e não-reduzores), durante o desenvolvimento da plântula;
- nos teores dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- nos cotilédones e no eixo embrionário;
- nos teores de aminoácidos livres e carboidratos solúveis (reduzores e não-reduzores) no eixo embrionário, relacionando-os à mobilização de reservas nos cotilédones;
- na atividade das principais enzimas envolvidas na mobilização lipídica e do amido nos cotilédones.

1.3. Revisão bibliográfica

1.3.1. Formação da semente

A semente é uma das mais importantes inovações que surgiram durante a evolução vegetal, sendo preponderante para que as plantas que a possuem dominem a flora atual (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Dentre os fatores que resultaram nessa maior vantagem seletiva sobre os grupos ancestrais (não-possuidores de sementes) podem-se citar a proteção que a semente proporciona ao embrião e a presença de substâncias de reserva que suprem as necessidades do mesmo até que este seja capaz de manter-se autotroficamente (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). A maioria das plantas com sementes está agrupada no filo *Magnoliophyta*, que compreende as Angiospermas (plantas com flores e frutos), as quais, por sua vez, são classificadas em Monocotiledôneas (classe *Liliopsida*) e Dicotiledôneas (classe *Magnoliopsida*), com base no número de cotilédones que possuem (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A formação da semente é sempre precedida pela fecundação, a qual, nas Angiospermas, pode ser dividida em três fases: i) polinização, que corresponde à transferência do grão de pólen do saco polínico, na antera, para um estigma receptivo compatível, pela ação de agentes físicos (vento ou água) ou biológicos (insetos, pássaros ou mamíferos); ii) acoplamento, que inclui todos os processos compreendidos desde a chegada do grão de pólen ao estigma até a aproximação das células espermáticas à oosfera [por exemplo, a adesão do grão de pólen ao estigma, a liberação e a ativação de enzimas envolvidas na formação do tubo polínico e o acesso do mesmo ao interior do óvulo (saco embrionário), resultando na liberação das duas células espermáticas]; e iii) singamia, que compreende a fusão de citoplasmas (plasmogamia) e núcleos (cariogamia) entre uma das células espermáticas e a oosfera, que originará o embrião, e da célula espermática restante com os núcleos polares da célula central, que originará o endosperma (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; COCUCCI; MARIATH, 2004; DUMAS; ROGOWSKY, 2008).

A semente pode ser constituída pelas seguintes partes: embrião, endosperma, perisperma e testa (envoltório da semente). Todas as sementes maduras contêm o embrião e a testa (ou envoltório); contudo, a presença do endosperma e do perisperma varia entre as espécies (BEWLEY; BLACK, 1994). O embrião é dividido em eixo embrionário e um cotilédone (monocotiledôneas) ou dois cotilédones (dicotiledôneas). O eixo embrionário, por sua vez, é compreendido pela radícula, hipocótilo (região abaixo do ponto de inserção do cotilédone ou cotilédones) e epicótilo (região acima do ponto de inserção do cotilédone ou cotilédones), no qual se inserem as primeiras folhas (plúmula) (BEWLEY; BLACK, 1994; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Os cotilédones apresentam diferentes funções. Em espécies cujas sementes maduras têm um endosperma vasto, denominadas albuminosas, os cotilédones muitas vezes são finos e membranosos, exercendo a função de absorção das reservas contidas no endosperma e, tão

logo a semente germine, adquirem capacidade fotossintetizante. Exemplos dessas espécies são *Ricinus communis* (mamona), *Zea mays* (milho) e *Sorghum bicolor* (sorgo forrageiro). Já aquelas cujas sementes maduras possuem uma pequena fração endospermica ou nas quais ela inexistente, denominadas exalbuminosas, os cotilédones funcionam como fontes de reserva e compreendem a maior parte da massa seca da semente, exemplificadas por *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda), *Pisum sativum* (ervilha) e *Glycine max* (soja) (BEWLEY; BLACK, 1994; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; MELO *et al.*, 2004).

As demais estruturas que compõem a semente provêm de tecidos parentais, isto é, não se originam a partir da fecundação ocorrida no óvulo. O perisperma origina-se a partir do nucelo, tecido responsável pela nutrição do óvulo, e quando presente, também funciona como fonte de reservas para o embrião em desenvolvimento. Exemplos de espécies cujas sementes possuem perisperma são *Coffea arabica* (cafeeiro) e *Beta vulgaris* (beterraba). Já a testa ou o envoltório da semente origina-se a partir do desenvolvimento dos tecidos que compõem a parede do óvulo (integumentos), funcionando como uma barreira protetora do embrião contra danos físicos e químicos, além de atuar no controle da germinação, e em algumas espécies, na dispersão da semente (BEWLEY; BLACK, 1994; OHTO; STONE; HARADA, 2007).

Na maioria das espécies, o desenvolvimento da semente pode ser dividido em três etapas confluentes. A primeira delas compreende a histodiferenciação da semente, sendo caracterizada por um grande número de divisões mitóticas — que resultam na formação do endosperma e do plano básico do embrião (eixo embrionário e cotilédones) — e por um rápido aumento no seu conteúdo de água. A segunda etapa corresponde à maturação da semente, na qual ocorre a expansão das células formadas e o acúmulo das substâncias de reserva nos cotilédones, endosperma ou perisperma, conforme o caso. Finalmente, o desenvolvimento da semente termina com a etapa de dessecação, em que ocorre um rápido declínio no conteúdo de água e na massa fresca da semente, levando o embrião a um estado

de metabolismo mínimo (estado quiescente). Quando a semente encontrar-se em condições ambientais favoráveis (adequada disponibilidade de água e luminosidade, bem como temperatura e concentração de gases ótimas), ela germinará (BEWLEY; BLACK, 1994; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004).

1.3.2. Germinação e estabelecimento da plântula

A germinação consiste numa série de eventos que se inicia com a embebição de água pela semente e termina com a emergência da radícula ou de outra parte do embrião (BEWLEY; BLACK, 1994). Dentre tais eventos, podem-se citar a reaquisição da permeabilidade seletiva das membranas celulares, a retomada da respiração e do metabolismo, o reparo do DNA e de outras macromoléculas que possam ter sido danificadas durante a etapa de dessecação e a iniciação da síntese de DNA, RNA e proteínas. Como mencionado, a emergência da radícula é o sinal de que a germinação findou e tal processo ocorre por alongamento ou expansão celulares, por meio dos tecidos que circundam o embrião. Dessa forma, a plântula fixa-se ao solo e torna-se capaz de absorver água (BEWLEY; BLACK, 1994; SRIVASTAVA, 2001; CASTRO; HILHORST, 2004).

Após a germinação, tem início uma etapa que se caracteriza por intensa mobilização das reservas que foram armazenadas no endosperma ou nos cotilédones durante o desenvolvimento e a maturação da semente (BEWLEY; BLACK, 1994). Essas substâncias funcionarão como fonte de energia, para manter processos metabólicos em funcionamento, ou como fonte de esqueletos de carbono, para a construção dos tecidos vegetais que constituirão a plântula, mas, no geral, as substâncias acumuladas servem para os dois fins (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a). A plântula, por sua vez, resulta do desenvolvimento do embrião logo após a germinação; esta denominação aplica-se enquanto o organismo depender das substâncias contidas nos tecidos de reserva da semente (MELO *et al.*, 2004). O término dessa fase do desenvolvimento geralmente coincide com o momento que a

plântula alcança a taxa de crescimento máximo, passando a depender da atividade fotossintética e a ser considerada como uma planta propriamente dita (HANLEY *et al.*, 2004). Há enorme variação na composição das sementes, mas as substâncias armazenadas em maiores quantidades são os carboidratos, os lipídios e as proteínas (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a).

A fase do desenvolvimento vegetal compreendida entre a germinação e o estabelecimento da plântula é de crucial importância para o sucesso reprodutivo das plantas. Dentre os fatores que podem influenciar a capacidade de sobrevivência das mesmas, encontram-se: quantidade e qualidade das reservas energéticas; morfologia funcional dos cotilédones; fatores abióticos (temperatura, disponibilidade de oxigênio e luz, excesso ou déficit hídrico, salinidade); e, finalmente, interações com outras espécies (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; MELO *et al.*, 2004; FENNER; THOMPSON, 2005).

1.3.3. Mobilização de reservas

1.3.3.1. Lipídios

Os lipídios são armazenados nos tecidos de reserva da semente sob a forma de triacilgliceróis (TAG) — três ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol — em organelas específicas, denominadas corpos lipídicos, oleossomos ou esferossomos (TAIZ; ZEIGER, 2004). A formação dos corpos lipídicos ocorre à medida que os TAG sintetizados no lúmen do retículo endoplasmático (RE) são seqüestrados na região entre as duas monocamadas da membrana do RE, o que é acompanhado pela inserção de proteínas integrais específicas, as oleosinas, nessa mesma região. Esse acúmulo de TAG e oleosinas gera uma protuberância que, eventualmente, se separa do RE e forma o corpo lipídico propriamente dito (HUANG, 1992; BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a). As oleosinas exercem as mais variadas funções, entre as quais pode-se citar: i) estabilização estrutural da

membrana do corpo lipídico; ii) aumento da carga residual dos corpos lipídicos, o que impede que essas organelas coalesçam; e iii) possível sítio de ancoragem das enzimas de degradação dos corpos lipídicos durante a mobilização de reservas (HUANG, 1992; TZEN; HUANG, 1992; SILOTO *et al.*, 2006).

A etapa inicial da mobilização de reservas lipídicas envolve a ação de lipases, enzimas que clivam a ligação éster dos TAG ou de seus derivados (diacilgliceróis e monoacilgliceróis), liberando uma molécula de glicerol e até três moléculas de ácidos graxos (HUANG, 1987; BEWLEY; BLACK, 1994). Dependendo da espécie, a atividade lipásica pode estar associada às membranas dos corpos lipídicos, como em mamona (EASTMOND, 2004a), girassol (GUPTA; BHATLA, 2005) e *Arabidopsis* (EASTMOND, 2006), ou dos glioxissomos, como em amendoim (HUANG; MOREAU, 1978).

A maior parte do glicerol resultante da ação das lipases sobre os TAG é convertida a glicerol-fosfato, no citosol, o qual é oxidado a diidroxiacetona-fosfato, na mitocôndria. Esse composto é um dos intermediários da gliconeogênese e, ao retornar ao citosol, contribui para a formação de hexoses, as quais são empregadas na síntese de sacarose, que será transportada para o eixo embrionário em crescimento (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004b; GRAHAM, 2008). Eastmond (2004b) demonstrou que plântulas de *Arabidopsis* que apresentavam mutações em um dos genes que codificam para a enzima quinase do glicerol (*gli1*, do inglês, *glycerol-insensitive*) eram incapazes de converter glicerol a glicerol-fosfato. Ao ser induzida a mutação concomitante dos genes *gli1* e *icl2* (do inglês, *isocitrate lyase*), este último representando o gene que codifica para a enzima liase do isocitrato, essencial para a mobilização de reservas lipídicas, houve um acúmulo exacerbado de glicerol nas células dos cotilédones, ao mesmo tempo em que as plântulas tiveram seu crescimento severamente inibido, em razão da incapacidade de tais mutantes em utilizarem os produtos da hidrólise dos TAG (EASTMOND, 2004b).

Os ácidos graxos produzidos pela ação das lipases sobre os TAG, por sua vez, precisam ser transportados para os glioxissomos, onde são oxidados a acetil-CoA, através da β -oxidação. Essas organelas são peroxissomos especializados na conversão de moléculas de acetil-CoA a succinato, por meio do ciclo do glioxalato (OLSEN; HARADA, 1995; PRACHAROENWATTANA; SMITH, 2008). A forma sob a qual os ácidos graxos adentram o glioxissomo ainda é duvidosa, mas há duas hipóteses. A primeira delas propõe a entrada dos ácidos graxos sob a forma livre (não-esterificados), os quais são imediatamente ativados pela ligação de uma molécula de coenzima A (CoA), através da ação da enzima sintetase do acil-CoA graxo; a segunda, refere-se à entrada de ácidos graxos já esterificados com uma molécula de CoA, reação esta que ocorre no citosol (GRAHAM, 2008). Dessa forma, é admissível que os glioxissomos estejam em íntimo contato com outras organelas envolvidas na mobilização de reservas lipídicas, tais como corpos lipídicos e mitocôndrias (HAYASHI *et al.*, 2001; BINNS *et al.*, 2006).

A clivagem dos acil-CoA graxos em moléculas de acetil-CoA durante a β -oxidação glioxissomal é mediada pela ação seqüencial de três enzimas: oxidase do acil-CoA, proteína multifuncional e tiolase. Esta última enzima, responsável pela liberação imediata de acetil-CoA, parece ser o passo regulador do ciclo (NELSON; COX, 2006); sua atividade específica foi significativamente menor que a das demais enzimas que a precedem na β -oxidação em cotilédones de plântulas de pepineiro (FREVERT; KINDL, 1980) e *Brassica napus* (HOPPE; THEIMER, 1997), o que corrobora tal afirmação. Além disso, plântulas de *Arabidopsis* exibindo uma mutação no principal gene (*kat2*, do inglês, *3-ketoacyl-CoA thiolase*) que codifica para a enzima tiolase foram incapazes de se estabelecerem, a não ser que uma fonte de carbono exógena fosse fornecida, tal como a sacarose, demonstrando o importante papel exercido pela β -oxidação durante a mobilização das reservas lipídicas (GERMAIN *et al.*,

2001). O acetil-CoA formado entra, então, no ciclo do glioxalato, o qual interliga a β -oxidação e a gliconeogênese.

O ciclo do glioxalato é uma forma modificada do ciclo de Krebs, no qual os passos de descarboxilação existentes neste último estão ausentes, permitindo a síntese líquida de esqueletos de carbono sob a forma de succinato, a partir do acetil-CoA, não havendo, assim, sua perda como CO₂, como acontece no ciclo de Krebs. Dentre as cinco enzimas que o compõem, três são igualmente pertencentes ao ciclo de Krebs: sintase do citrato, aconitase e desidrogenase do malato; as duas enzimas restantes, liase do isocitrato (que cliva o isocitrato em succinato e glioxalato) e sintase do malato (que condensa uma molécula de acetil-CoA a uma de glioxalato, formando malato) são exclusivas desta via (BEEVERS, 1980; NELSON; COX, 2006). Até bem pouco tempo atrás, acreditava-se que a reação catalisada pela enzima aconitase era a única a acontecer fora dos glioxissomos, mais precisamente, no citosol, como observado por Hayashi *et al.* (1995). Entretanto, Pracharoenwattana, Cornah e Smith (2007) demonstraram que em cotilédones de plântulas de *Arabidopsis thaliana* a isoforma glioxissomal da enzima desidrogenase do malato está envolvida apenas na oxidação do NADH produzido pela β -oxidação, não participando diretamente do ciclo do glioxalato, que depende de isoformas citosólicas ou mitocondriais desta enzima para regenerar seu aceptor inicial, o oxaloacetato.

Outra questão levantada recentemente acerca desta via é sua não-essencialidade durante a germinação e estabelecimento da plântula (EASTMOND; GRAHAM, 2001). Estudos envolvendo mutações nos genes que codificam para as enzimas liase do isocitrato (*icl*) e sintase do malato (*mls*, do inglês, *malate synthase*), em cotilédones de plântulas de *Arabidopsis*, têm confirmado tal hipótese. Plântulas *icl* se estabelecem normalmente e não apresentam inibição na mobilização dos lipídios existentes em seus cotilédones, o que levou Eastmond *et al.* (2000) a sugerirem que o citrato formado pela primeira reação do ciclo é

incorporado ao ciclo de Krebs e conseqüentemente respirado. Já plântulas *mls* se estabelecem e mobilizam seus lipídios mais rapidamente que plântulas *icl*, diferindo pouco de plântulas não-mutantes. Elas também possuem elevados níveis dos aminoácidos glicina e serina, como resultado da entrada do glioxalato no ciclo fotorrespiratório (CORNAH *et al.*, 2004).

O succinato, principal produto do ciclo do glioxalato, entra na mitocôndria e é convertido a malato pelas enzimas do ciclo de Krebs. Este composto, por sua vez, é transportado para o citosol, onde é oxidado a oxaloacetato e em seguida, convertido a fosfoenolpiruvato, um dos intermediários da gliconeogênese, o que resulta na produção de hexoses que serão utilizadas na síntese de sacarose, a principal forma de carbono transportada para o eixo embrionário em crescimento (BEWLEY; BLACK, 1994; TAIZ; ZEIGER, 2004). A enzima carboxiquinase do fosfoenolpiruvato, responsável pela conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, é essencial para o estabelecimento da plântula em *Arabidopsis*, como observado por Rylott *et al.* (2003), através de estudos com plântulas mutantes *pck* (do inglês, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*).

1.3.3.2. Proteínas

Segundo Osbourne (1924), as proteínas vegetais, incluindo as de reserva em sementes, podem ser classificadas em quatro grupos, baseados na sua solubilidade em uma série de solventes: i) albuminas, solúveis em água; ii) globulinas, insolúveis em água e solúveis em soluções salinas; iii) prolaminas, solúveis em álcool, mas não em água ou soluções salinas; e iv) glutelinas, insolúveis em soluções aquosas neutras ou salinas e em álcool, podendo ser extraídas em soluções ácidas ou básicas.

Em sementes de dicotiledôneas, tais como ervilha (*P. sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*), a principal fração protéica é representada pelas globulinas, que podem ser divididas em leguminas (11S) e vicilinas (7S), com base em seu coeficiente de

sedimentação; em algumas espécies, também podem ser encontradas albuminas, classificadas como 2S. Já as prolaminas correspondem à principal fração protéica em certos cereais, tais como trigo (*Triticum aestivum*), sorgo (*S. bicolor*) e milho (*Z. mays*); no entanto, em arroz (*Oriza sativa*), a fração de glutelinas é a mais representativa (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995; SRIVASTAVA, 2001; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a).

As proteínas de reserva são inicialmente sintetizadas nos polissomos do citosol, e em seguida, direcionadas para o retículo endoplasmático (RE), adentrando o lúmen do RE à medida que sua síntese é continuada. Neste local, as proteínas sofrem processamento (inserção de pontes dissulfeto, glicosilação, etc.), se enovelam corretamente, com o auxílio das chaperonas, e sofrem oligomerização (HERMAN; LARKINS, 1999).

As proteínas de reserva em sementes podem ser armazenadas em dois tipos de estruturas: corpos protéicos e vacúolos protéicos. Os corpos protéicos originam-se diretamente do RE, podendo a ele permanecerem ligados ou tornarem-se livres no citosol. Já os vacúolos protéicos resultam da fusão de inúmeras vesículas originadas do complexo de Golgi, para onde as proteínas de reserva foram encaminhadas após sua síntese no RE (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995; MÜNTZ, 1998).

A mobilização das proteínas de reserva em seus aminoácidos constituintes é realizada por uma classe de enzimas, as proteases, que são classificadas de acordo com sua atividade hidrolítica em endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas ao polipeptídio, produzindo oligopeptídios, os quais são clivados pelas peptidases, ou exopeptidases, que clivam a partir das extremidades da cadeia polipeptídica. As exopeptidases podem ser divididas, ainda, em aminopeptidases, que clivam as proteínas a partir de sua extremidade N-terminal, e carboxipeptidases, que clivam as proteínas a partir de sua extremidade C-terminal (ASHTON, 1976; BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004b).

Em cereais, o endosperma corresponde ao principal local de acúmulo das proteínas de reserva (cerca de 70% do total), seguido pela camada de aleurona (30% do total); além disso, uma pequena percentagem pode estar presente no escutelo e no eixo embrionário, com o propósito de suprir o crescimento inicial deste órgão até que a mobilização das reservas do endosperma se inicie (BEWLEY; BLACK, 1994). As proteases envolvidas na mobilização protéica no endosperma podem ser oriundas dele próprio, onde foram armazenadas durante a maturação da semente, ou da camada de aleurona, provenientes da síntese *de novo* a partir dos aminoácidos liberados pela degradação das proteínas de reserva contidas nesse tecido (BEWLEY; BLACK, 1994; MÜNTZ *et al.*, 2001).

Em sementes de dicotiledôneas, os cotilédones correspondem aos principais locais de acúmulo das proteínas de reserva, cuja degradação também depende da síntese *de novo* de proteases e da ação combinada de endopeptidases e carboxipeptidases já contidas nos corpos protéicos. Com o fim da proteólise, os corpos protéicos vazios fundem-se e formam grandes vacúolos, onde se encontra uma variedade de hidrolases, transformando-se em vesículas autofágicas responsáveis pela senescência e degeneração dos cotilédones (BEWLEY; BLACK, 1994; MÜNTZ, 1996; BUCKERIDGE *et al.*, 2004b).

Os aminoácidos resultantes da hidrólise das proteínas são utilizados na síntese *de novo* de outras proteínas ou convertidos a amidas (asparagina e glutamina) no escutelo (cereais) ou nos próprios cotilédones (dicotiledôneas), que são transportadas para o eixo em crescimento (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004b). Essa conversão é proporcionada pela ação de diferentes enzimas, entre as quais, as aminotransferases, que transferem o grupo α -amino dos aminoácidos para o α -cetoglutarato, produzindo glutamato; a sintetase da glutamina (GS, do inglês, *glutamine synthetase*), que condensa amônia e glutamato, formando glutamina; e a sintetase da asparagina, que catalisa a síntese de asparagina a partir de aspartato e glutamina. O aumento na atividade dessas enzimas foi concomitante à época de

mais intensa mobilização protéica, durante a germinação e estabelecimento da plântula em diferentes espécies (ISOLA; FRANZOINI, 2000; GLEVAREC *et al.*, 2004; HERRERA-RODRIGUEZ; MALDONADO; PÉREZ-VICENTE, 2006).

Uma vez no eixo, as amidas provenientes dos tecidos de reserva são interconvertidas nas suas respectivas aminas (aspartato e glutamato) pela ação das enzimas asparaginase e sintase do glutamato (GOGAT, do inglês *glutamine oxoglutarate aminotransferase*). Adicionalmente, o glutamato pode ser desaminado pela ação da enzima desidrogenase do glutamato (GDH, do inglês *glutamate dehydrogenase*), fornecendo esqueletos de carbono para a respiração celular (BEWLEY; BLACK, 1994; LEHMANN; RATAJCZAK, 2008). Tal fato foi constatado por Glevarec *et al.* (2004), ao estudarem a expressão gênica e a atividade das enzimas GS, GOGAT e GDH em cotilédones e eixo embrionário de plântulas de *Medicago truncatula*. Esses autores sugeriram que a GDH presente no eixo embrionário de tais plântulas atua, principalmente, na direção da desaminação do glutamato, uma vez que não houve a incorporação de $^{15}\text{NH}_4^+$ quando a GS foi especificamente inibida. O aumento na atividade da GDH também foi observado quando eixos embrionários de plântulas de lupino foram mantidos isolados de seus cotilédones em um meio na ausência de uma fonte de carbono, que reforça seu papel no fornecimento de esqueletos de carbono para o desenvolvimento da plântula (LEHMANN *et al.*, 2003).

1.3.3.3. Amido e outros carboidratos

Os principais carboidratos que atuam como reserva em sementes são os polissacarídeos de reserva de parede celular e o amido (BEWLEY; BLACK, 1994). O amido é o composto de reserva de mais ampla ocorrência nas plantas superiores, ao passo que os polissacarídeos de reserva da parede celular ocorrem em apenas alguns grupos taxonômicos. Adicionalmente, podem-se também encontrar quantidades variáveis de sacarose e de oligossacarídeos da série rafínósica na semente, embora estes compostos não sejam

considerados substâncias de reserva (BEWLEY; BLACK, 1994). A sacarose é encontrada universalmente, enquanto os oligossacarídeos da série rafínósica ocorrem em um grande número de sementes de dicotiledôneas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004a).

O amido é formado por dois tipos de polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina, que juntos formam os grânulos de amido, os quais estão presentes no interior de plastídios especializados para esse fim, os amiloplastos (WANG; BOGRACHEVA; HEDLEY, 1998; NELSON; COX, 2006). A amilose consiste de uma cadeia de 1.000 resíduos de glicose, em média, unidos por meio de ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4) e com disposição espacial em α -hélice, predominantemente linear; além disso, compreende cerca de 30% de todo o amido presente nos grânulos. A amilopectina, por sua vez, corresponde ao principal componente dos grânulos de amido (aproximadamente 70%) e consiste de cadeias de até 10^6 resíduos de glicose, unidos por ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4), interligadas por ligações α -(1 \rightarrow 6) a cada 25 resíduos de glicose, em média, formando, assim, uma estrutura altamente ramificada (BEWLEY; BLACK, 1994; WANG; BOGRACHEVA; HEDLEY, 1998; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a; NELSON; COX, 2006). Os grânulos de amido tendem a apresentar grande variabilidade de tamanho e de proporção entre os seus constituintes, em razão de fatores ambientais e das peculiaridades de cada espécie, variedade e tecido em questão, no entanto, é o arranjo e a proporção de amilopectina que dita sua forma (BEWLEY; BLACK, 1994; SMITH *et al.*, 1997; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a).

A mobilização do amido de reserva traduz-se no desmembramento dos grânulos de amido em estruturas menores, como a maltose e a glicose. Há duas formas de o amido ser degradado: a hidrolítica e a fosforolítica. Na primeira delas, destacam-se as enzimas α -amilase e β -amilase, enquanto na segunda, a enzima fosforilase do amido é a mais representativa. Dessas enzimas, somente a α -amilase é capaz de atacar diretamente os grânulos de amido, o

que a caracteriza como a primeira enzima a atuar nesse processo, independentemente da via de degradação atuante (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004b).

A α -amilase é uma endoglucanase que hidrolisa aleatoriamente as ligações α -(1 \rightarrow 4) ao longo dos polímeros de amilose e amilopectina, liberando oligossacarídeos e moléculas maiores, as dextrinas, quem contêm as ligações α -(1 \rightarrow 6). Já a β -amilase é uma exoglucanase que ataca somente as extremidades não-redutoras da amilose e amilopectina a cada dois resíduos de glicose, liberando moléculas de β -maltose e dextrinas, visto que também não conseguem clivar as ligações α -(1 \rightarrow 6) existentes na amilopectina. As moléculas de maltose liberadas pela ação das amilases raramente se acumulam durante a degradação do amido, pois são imediatamente clivadas pela enzima α -glucosidase, liberando, dessa forma, duas moléculas de glicose (BUCKERIDGE *et al.*, 2004b; NELSON; COX, 2006). A fosforilase do amido, por sua vez, é uma exoglucanase que degrada o amido pela liberação de glicose-1-fosfato a partir de suas extremidades não-redutoras. Assim como as amilases, a fosforilase do amido não é capaz de clivar as ligações α -(1 \rightarrow 6) existentes na amilopectina. Essas ligações só podem ser clivadas pela enzima desramificadora, que proporciona a liberação das extremidades redutoras, que se tornam prontamente acessíveis pelas exoglucanases (β -amilase e fosforilase do amido), resultando na degradação completa dos grânulos de amido em maltose, glicose ou glicose-1-fosfato (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004b; NELSON; COX, 2006).

Em geral, em monocotiledôneas, as reservas de amido encontram-se no endosperma, o qual é formado por células mortas. Dessa forma, faz-se necessária a colaboração de tecidos vivos adjacentes para que a mobilização do amido ocorra (BUCKERIDGE *et al.*, 2004b). Dentre os tecidos que desempenham tal função, destacam-se o escutelo e a camada de aleurona, podendo, em algumas espécies, ocorrer o predomínio funcional de um tecido sobre o outro (BEWLEY; BLACK, 1994; RITCHIE; SWANSON; GILROY, 2000).

As α -amilases, com poucas exceções, não estão presentes em sementes quiescentes, sendo sintetizadas *de novo* tanto pelo escutelo quanto pela camada de aleurona e secretadas no endosperma; este processo está sob regulação do hormônio vegetal giberelina (RITCHIE; SWANSON; GILROY, 2000; BUCKERIDGE *et al.*, 2004b). As β -amilases já se encontram no endosperma sob as formas livre e ligada aos corpos protéicos. Esta última necessita da ação de proteases produzidas pelo escutelo ou pela camada de aleurona para tornar-se ativa, ao passo que a primeira, já o é, assumindo um importante papel no início da mobilização do amido. Já a enzima desramificadora e a α -glucosidase também são sintetizadas *de novo*, principalmente pela camada de aleurona, sob a regulação de giberelinas, e secretadas no endosperma (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004b). De modo geral, os produtos da mobilização do amido são absorvidos pelo escutelo e transportados para o embrião, onde serão utilizados para o crescimento inicial da plântula (BEWLEY; BLACK, 1994).

Em dicotiledôneas, o processo de mobilização do amido é ligeiramente diferente, tendo em vista que ocorre no interior de células vivas, em sua maioria nos cotilédones, em que a mobilização do amido e a síntese de sacarose acontecem na mesma célula, exigindo um controle ainda mais integrado do que aquele existente em monocotiledôneas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004b). Monerri, Garcia-Luis e Guardiola (1986), ao estudarem a mobilização de reservas durante a germinação, em ervilha, não observaram a existência dos produtos da mobilização hidrolítica do amido (maltose, maltotriose e dextrinas) nos cotilédones de plântulas dessa espécie, o que os levaram a sugerir que a via de degradação fosforolítica do amido prevaleceu, em detrimento da via hidrolítica. Contudo, poucas são as informações contundentes acerca da mobilização do amido durante a germinação em espécies dicotiledôneas.

Os polissacarídeos de reserva da parede celular (PRPC) são sintetizados por enzimas ligadas à membrana do complexo de Golgi, sendo liberados no espaço intercelular através de vesículas, onde são empregados na automontagem da parede celular (BUCKERIDGE *et al.*, 2004a; TAIZ; ZEIGER, 2004). A parede celular é formada por três domínios independentes (celulose-hemicelulose, pectina e proteínas); os PRPC resultam de variações nessa composição, em que um domínio ou um de seus polissacarídeos constituintes é depositado em maior quantidade, em relação aos demais (BUCKERIDGE; SANTOS; TINÉ, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004). Assim, os PRPC podem corresponder tanto a hemiceluloses, tais como mananos, galactomananos, glucomananos e xiloglucanos, quanto a pectinas, tal como arabinogalactanos, podendo ser encontrados em sementes de monocotiledôneas e dicotiledôneas (BUCKERIDGE; SANTOS; TINÉ, 2000).

A mobilização dos PRPC é realizada por enzimas hidrolíticas que são sintetizadas *de novo* e secretadas no tecido de reserva correspondente (endosperma ou cotilédones), entre as quais se destacam a endo- β -mananase, a β -manosidase e as α - e β -galactosidases (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE; SANTOS; TINÉ, 2000). Os monossacarídeos manose, galactose e glicose, principais produtos da mobilização dos PRPC, são prontamente absorvidos e metabolizados pelos cotilédones, onde são direcionados para a síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994).

A sacarose pode ser encontrada em quantidades apreciáveis em várias partes da semente (cotilédones, endosperma ou eixo embrionário), assim como os oligossacarídeos da série rafínosica. Ambas os compostos são remanescentes do processo de acúmulo de reservas ocorrido durante a formação da semente e juntos, representam os primeiros compostos a serem degradados para o suprimento de energia e de esqueletos de carbono, antes mesmo que a germinação (emersão da radícula) se complete (BEWLEY; BLACK, 1994; PETERBAUER; RICHTER, 2001).

1.3.3.4. Controle da mobilização de reservas

Como a mobilização de reservas tem a finalidade de subsidiar o crescimento e o desenvolvimento da plântula, é essencial que tais processos sejam sincronizados, e isso depende de um sistema de comunicação entre os tecidos de reserva e o embrião, cujos mecanismos parecem ser diferentes daqueles que controlam a germinação (PRITCHARD *et al.*, 2002). Os sinais, nesse caso, são químicos, e normalmente envolvem os níveis internos e o transporte de hormônios, carboidratos e compostos nitrogenados (BUCKERIDGE *et al.*, 2004b).

Como já mencionado, o principal tecido de reserva em cereais é o endosperma, cuja mobilização está sob regulação do hormônio vegetal giberelina, que é sintetizado no escutelo e transportado para a camada de aleurona, onde induz a transcrição dos genes de diferentes hidrolases, que em seguida são secretadas no endosperma, tornando-se as responsáveis pela mobilização das reservas nele contidas. Entre essas, destacam-se as enzimas α -amilase, endopeptidase, carboxipeptidase, nucleases (RNase e DNase), α -glucosidase e (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -glucanase, esta última, envolvida na degradação da parede celular, o que permite o acesso das demais enzimas aos grânulos de amido e corpos protéicos presente no citoplasma (BEWLEY; BLACK, 1994; SRIVASTAVA, 2001).

Diferentemente das sementes de cereais, em que as enzimas envolvidas na mobilização de reservas são produzidas em um tecido à parte do local em que atuam, nas demais sementes, incluindo as de outras monocotiledôneas e dicotiledôneas, elas são produzidas no mesmo tecido em que as reservas estão contidas (BEWLEY; BLACK, 1994). Porém, a sincronia entre a mobilização de reservas e o crescimento da plântula é igualmente necessária, sugerindo que o eixo embrionário ou o embrião também exerce um importante papel nessa regulação. Há dois modos de o eixo embrionário controlar a mobilização de

reservas em sementes de dicotiledôneas: o controle hormonal e o controle fonte-dreno (DAVIES; SLACK, 1981; BEWLEY; BLACK, 1994).

As evidências do envolvimento hormonal no controle da mobilização de reservas advêm de experimentos em que os diferentes hormônios vegetais foram fornecidos aos cotilédones (ou endosperma) separados do eixo embrionário, na tentativa de reproduzir suas funções. Com tal abordagem, pôde-se constatar que as citocininas estão relacionadas com o aumento da atividade amilolítica e proteolítica em cotilédones de plântulas de *Cicer arietinum* (MUÑOZ *et al.*, 1990) e lupino (NANDI; PALNI; KLERK, 1995) e com o aumento da atividade da liase do isocitrato em cotilédones de plântulas de melancia (LONGO *et al.*, 1979). Por outro lado, as giberelinas estão envolvidas com o aumento da atividade das enzimas liase do isocitrato e fosfatase alcalina em cotilédones de plântulas de macieira (BOGATEK *et al.*, 1989), bem como com o aumento da atividade proteolítica no endosperma de manona (GILFFORD; THAKORE; BEWLEY, 1984) e a expressão de uma protease cisteínica em cotilédones de plântulas de *Vigna mungo* (TANEYAMA *et al.*, 2001). Convém salientar que o aumento e manutenção da atividade enzimática nos cotilédones ou endosperma, durante a mobilização de reservas, são mediados pela síntese *de novo* ou pela ativação de enzimas pré-existentes (BEWLEY; BLACK, 1994).

Tendo em vista que o eixo embrionário comporta-se como um dreno para os produtos da mobilização de reservas, pode-se inferir que o controle que ele exerce sobre esse processo é através da prevenção do acúmulo desses produtos, evitando que as enzimas envolvidas na mobilização de reservas sejam inibidas por *feedback* negativo, caso alcancem concentrações muito elevadas (DAVIES; SLACK, 1981; BEWLEY; BLACK, 1994). A remoção do eixo embrionário de plântulas, durante a germinação e seu estabelecimento, resulta na redução da taxa de degradação de reservas nos cotilédones, que é acompanhada pelo acúmulo de carboidratos e aminoácidos nesses tecidos, como observado em plântulas de pepineiro

(DAVIES; CHAPMAN, 1979a, 1979b). A atividade proteolítica em cotilédones de lentilha diminuiu significativamente com a remoção do eixo embrionário (CACHO *et al.*, 1997), ao passo que a atividade *in vitro* de uma aminopeptidase isolada de cotilédones de pepineiro foi severamente inibida por dipeptídios, tripeptídios e aminoácidos livres, produtos da mobilização de proteínas (DAVIES; CHAPMAN, 1980), o que reforça a hipótese da inibição por *feedback* negativo.

1.3.4. Salinidade, germinação e estabelecimento da plântula

A salinidade é um dos estresses abióticos que mais limita a produção agrícola, em razão de seus efeitos no crescimento e desenvolvimento vegetal, os quais podem ser de natureza iônica, osmótica ou de ambas (GREENWAY; MUNNS, 1980; PRISCO, 1980; HASEGAWA *et al.*, 2000). Os efeitos iônicos resultam da elevada absorção de íons, especialmente Na^+ e Cl^- , que em altas concentrações, alteram a homeostase iônica da célula, a qual é de fundamental importância para as atividades de muitas enzimas citosólicas e para a manutenção do potencial de membrana celular (NIU *et al.*, 1995; HASEGAWA *et al.*, 2000; ZHU, 2003). Portanto, os efeitos dos sais podem perturbar as funções fisiológicas e bioquímicas da célula e podem conduzir a planta à morte (MANSOUR; SALAMA, 2004). Os efeitos osmóticos, decorrentes da redução do potencial hídrico do ambiente radicular, acarretam a diminuição da disponibilidade de água para a semente, plântula ou planta (GREENWAY; MUNNS, 1980; PRISCO, 1980; MUNNS, 2002). Secundariamente, a salinidade também induz o estresse oxidativo, ao provocar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o radical livre hidroxil (OH^{\bullet}). Tais espécies, quando em altas concentrações, são prejudiciais à célula, podendo causar danos oxidativos aos lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (MITTLER, 2002; AZEVEDO NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008).

Dentre os mecanismos desenvolvidos pelas plantas ao longo do processo evolutivo que lhes permitiram enfrentar o estresse salino pode-se citar: o controle da absorção de íons pela raiz e de seu transporte para as folhas; a compartimentalização de íons, nas células e na planta inteira; o acúmulo no citoplasma de solutos orgânicos compatíveis; alterações na estrutura da membrana plasmática; indução de enzimas antioxidativas; e alteração no balanço hormonal (GREENWAY; MUNNS, 1980; HASEGAWA *et al.*, 2000; PARIDA; DAS, 2005). Em relação à tolerância à salinidade, três aspectos são relevantes: primeiro, o desenvolvimento de mecanismos como os citados anteriormente, a fim de minimizar os danos sofridos; segundo, o restabelecimento da homeostase celular; e, finalmente, a retomada do crescimento, mesmo que a uma velocidade reduzida (ZHU, 2001; MANSOUR; SALAMA, 2004; BOTELLA *et al.*, 2005; MUNNS; TESTER, 2008).

O grau com que a salinidade afeta o crescimento depende de fatores intrínsecos à planta (espécie, cultivar e estágio de desenvolvimento), fatores relacionados ao estresse (tipo de sal, concentração salina, tempo de exposição aos sais e seu modo de aplicação) e fatores ambientais (luz, temperatura e umidade relativa do ar), bem como da interação entre eles (GREENWAY; MUNNS, 1980; MUNNS; TERMAAT, 1986; SHANNON; GRIEVE, 1999; BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000). Enquanto algumas espécies apresentam elevada tolerância à salinidade (halófitas), outras são altamente susceptíveis (glicófitas). A maioria das culturas é afetada por uma condutividade elétrica do extrato de saturação do solo (CE_{es}) superior a $3,0 \text{ dS.m}^{-1}$ (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005). Convém salientar que mesmo em baixas concentrações de sais, a maioria das espécies cultivadas tem seu crescimento inibido ou retardado (GREENWAY; MUNNS, 1980).

De acordo com o Laboratório de Salinidade dos Estados Unidos, um solo é considerado salino quando a CE_{es} é maior que $4,0 \text{ dS.m}^{-1}$ (RICHARDS, 1954). Os principais íons encontrados nos solos salinos são os cátions Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} e os ânions Cl^- e SO_4^{2-} .

Encontram-se em menor quantidade, os íons K^+ , HCO_3^- , CO_3^{2-} e NO_3^- (DAKER, 1988; CORDEIRO, 2001). Esses solos concentram-se, principalmente, em regiões de clima árido e semi-árido, onde a intensa evaporação e sua incompleta lixiviação concorrem para o aumento da concentração dos sais no solo e nas águas superficiais, acarretando incremento da CE_{es} e diminuição do potencial osmótico (Ψ_s) dos mesmos, com conseqüente abaixamento do potencial hídrico (Ψ_w) (PRISCO, 1980; DAKER, 1988).

A origem natural desses sais no solo decorre do intemperismo químico de minerais e rochas da crosta terrestre, os quais têm seus constituintes gradualmente liberados, tornando-se solúveis. Adicionalmente, o uso de água de irrigação de baixa qualidade, associado à falta ou deficiência de uma adequada drenagem, pode acarretar a salinização do solo (DAKER, 1988; CORDEIRO, 2001). Estima-se que 19,5% das áreas irrigadas em todo o mundo — o que corresponde a 45 milhões de hectares — enfrentem problemas devido à salinidade, e no Brasil, este percentual encontra-se entre 20 e 25%, concentrado principalmente na região Nordeste (FAGERIA; GHEYI, 1997; FAO, 2000).

Como mencionado anteriormente, o fator que promove a iniciação da germinação é a embebição de água pela semente, cujo Ψ_w é ditado principalmente pelo seu componente mátrico (Ψ_m) (BEWLEY; BLACK, 1994; NONOGAKI; CHEN; BRADFORD, 2007). O gradiente de potencial hídrico ($\Delta\Psi_w$) entre a semente e o solo é muito elevado — um valor usual para o Ψ_w de sementes está entre -350 MPa e -14 MPa, dependendo da espécie (ROBERTS; ELLIS, 1989) — o que resulta na embebição de água pela semente, independentemente de sua viabilidade. No entanto, quando as sementes germinam na presença de um baixo Ψ_w , há uma redução nesse $\Delta\Psi_w$, em comparação às condições ótimas de germinação, o que pode frear a embebição; caso o Ψ_w do ambiente seja suficientemente baixo (-2,0 MPa a -1,5 MPa), a inibição da emersão da radícula pode sobrevir (BRADFORD, 1995).

Sabe-se, há bastante tempo, que quando uma semente germina em um ambiente salino, há uma redução na velocidade e na percentagem final de germinação, em função não apenas da diminuição do $\Delta\Psi_w$ — efeito osmótico — como também dos níveis elevados dos íons na semente — efeito iônico (PRISCO, 1987). Prisco e O’Leary (1970), ao estudarem a germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* na presença de soluções isosmóticas de NaCl e polietilenoglicol (PEG), observaram que a inibição da germinação foi mais pronunciada naquelas semeadas em NaCl; quando submetidas a um Ψ_w de até -0,8 MPa, os efeitos osmóticos da salinidade foram mais perceptíveis, ao passo que em Ψ_w inferior a esse valor, os efeitos iônicos da salinidade pareceram preponderar. Essa conclusão também foi sustentada por Bliss, Platt-Aloia e Thomson (1986), ao avaliarem os efeitos tóxicos da salinidade durante a germinação de sementes de cevada.

Assim como no crescimento e produtividade agrícola, a intensidade com que o estresse salino afeta a germinação depende, primordialmente, de um conjunto de fatores relacionados à semente (vigor, forma e morfologia da testa), ao tipo de sal, concentração salina e tempo de exposição, bem como às condições ambientais (temperatura, luminosidade, oxigênio e umidade relativa do ar) (WAHID; RASUL; RAO, 1999).

Em glicófitas, a etapa de estabelecimento da plântula é mais afetada pela salinidade do que a de germinação (PRISCO, 1987). Estudos com diferentes espécies, tais como pimenta (CHARTZOULAKIS; KLAPAKI, 2000), soja (HOSSEINI; POWELL; BINGHAM, 2002) e *Cicer arietinum* (ESECHIE; AL-SAIDI; AL-KHANJARI, 2002), têm corroborado tal afirmativa. Isso se deve, provavelmente, à elevada absorção de íons Na^+ e Cl^- , que em excesso, alteram significativamente o metabolismo celular da plântula. Assim, os efeitos deletérios da salinidade podem ser evidenciados tanto nos tecidos de reserva da semente, resultando na inibição da mobilização de reservas, quanto no próprio embrião ou eixo

embrionário em crescimento, pela alteração na sua homeostase iônica e no seu sistema de membranas (PRISCO, 1987; WAHID; RASUL; RAO, 1999).

1.3.5. Cajueiro

1.3.5.1. Características morfológicas

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) pertence à divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, subclasse *Rosidae*, ordem *Sapindales*, família *Anacardiaceae* e gênero *Anacardium* (CRONQUIST, 1988). É uma espécie originária do Brasil e acredita-se que o litoral do Nordeste tenha sido o centro de origem dos materiais hoje usados comercialmente (LIMA, 1988). É uma planta perene que atinge 5 a 8 m de altura no tipo comum e não mais que 4 m, no tipo anão-precoce (BARROS, 1995). Possui folhas simples, alternas e de aspecto coriáceo, sistema radicular do tipo axial, podendo alcançar até 10 m de profundidade, inflorescência do tipo panícula, onde podem ser encontradas flores masculinas e hermafroditas com cinco pétalas, cinco sépalas, um ovário simples e sete a quinze estames, e fruto (castanha) do tipo aquênio, consistindo em epicarpo, mesocarpo, endocarpo e a amêndoa (BARROS, 1995). Esta, por sua vez, corresponde à semente propriamente dita; tem formato reniforme, com dois cotilédones brancos, carnosos, revestidos por uma película (testa), sendo composta principalmente por lipídios (46,1%), seguidos de carboidratos (22,5%) e proteínas (21,3%), mas essa proporção pode variar entre os tipos comum e anão-precoce (e nos seus diferentes clones) (MAIA; HOLANDA; MARTINS, 1971; SOUZA-FILHO *et al.*, 1989; BARROS, 1995).

Com base na seqüência de mudanças morfológicas que ocorrem durante a germinação e estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce, foram descritos nove estádios de desenvolvimento (ED) da plântula (CAVALCANTI JUNIOR, 1994), com características morfo-fisiológicas próprias: ED 0 (zero) – castanhas quiescentes; ED 1 – castanhas

intumescidas; ED 2 – castanhas com radículas emergidas; ED 3 – plântulas com o comprimento do eixo hipocótilo-radícula superior ao limite inferior da ponta da castanha; ED 4 – plântulas iniciando a emergência do solo; ED 5– plântulas com o epicótilo ainda preso entre os cotilédones; ED 6 – plântulas com epicótilo ereto, mas com os quatro folíolos na extremidade apical; ED 7 – plântulas com folhas alternas; e, finalmente, ED 8 – plântulas com início de formação de gemas axilares.

1.3.5.2. Cajucultura, irrigação e salinidade

A cajucultura tem grande importância sócio-econômica, principalmente para a região Nordeste do Brasil, que responde por 100% da produção nacional, possuindo uma área plantada superior a 740 mil hectares (OLIVEIRA, 2002; IBGE, 2008). O estado do Ceará é seu maior produtor, perfazendo 39% do total (IBGE, 2008). No âmbito internacional, além do Brasil, destacam-se como principais produtores Vietnã, Nigéria, Índia e Costa do Marfim (FAO, 2009). A industrialização do caju visa, basicamente, ao aproveitamento da amêndoa da castanha de caju (ACC) e, em menor escala, à extração do líquido da casca da castanha (LCC), empregado na fabricação de tintas, vernizes, isolantes, colas fenólicas e inseticidas, existindo, ainda, o aproveitamento do pedúnculo na fabricação de sucos, polpa, refrigerante, cajuína, aguardente, vinho e doces variados (PAULA PESSOA; LEITE; PIMENTEL, 1995; OLIVEIRA, 2002). Nos últimos anos, a cajucultura tem gerado cerca de 140 milhões de dólares anuais com as exportações de ACC e LCC, sem considerar os valores provenientes da comercialização de sucos e outros derivados do caju (OLIVEIRA, 2004). No Brasil, sua importância social traduz-se pelo número de empregos diretos que gera, sendo 35 mil no campo e 15 mil na indústria, além de 250 mil empregos indiretos nos dois segmentos (OLIVEIRA, 2002).

A variabilidade genética do cajueiro permite agrupá-lo em dois tipos, o comum e o anão-precoce, assim denominados em função do porte. O tipo comum ainda é o mais

cultivado, mas sua capacidade produtiva individual é muito variável. Com a introdução do cajueiro anão-precoce, pôde-se conseguir um aumento significativo na produtividade. Quando em condições de sequeiro, pode-se alcançar uma produtividade média por hectare de 1 t de castanha e 10 t de pedúnculo, porém, sob irrigação, pode-se chegar a 3,8 t de castanha e 30 t de pedúnculo (BARROS, 2008).

Partindo-se do princípio que a cajucultura irrigada é uma alternativa promissora para o Nordeste, especialmente para o Ceará, deve-se levar em conta que muitas das nossas fontes de água são salobras (principalmente as provenientes de poços). Além disso, a irrigação realizada de maneira inadequada pode provocar salinização dos solos e prejuízos para as culturas. Portanto, é de fundamental importância que a expansão da área irrigada seja acompanhada por um programa intenso e integrado de pesquisas básicas e aplicadas em irrigação, drenagem e salinização. Essas pesquisas são relevantes, pois o conhecimento dos mecanismos responsáveis pela tolerância ao estresse facilitaria o desenvolvimento de técnicas de manejo da água, do solo e da cultura, além de poder fornecer subsídios para o melhoramento do cajueiro, seja ele desenvolvido através de seleção e hibridação ou via engenharia genética.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos diversos estudos sobre os efeitos do estresse salino no desenvolvimento de cajueiro anão-precoce. De modo geral, o crescimento da planta jovem é severamente afetado pela salinidade na proporção em que aumenta a concentração de sais no ambiente radicular, havendo reduções significativas na área foliar e na massa seca da parte aérea (BEZERRA *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2004) e na condutância estomática e na taxa fotossintética (BEZERRA *et al.*, 2005). Tais efeitos também foram observados quando o cajueiro ainda encontrava-se na fase de plântula (MARQUES, 2007; ABREU *et al.*, 2008; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2008). O acúmulo dos íons Na^+ e Cl^- , sob condições salinas, também foi relatado para essa espécie, sendo os maiores teores encontrados nas raízes, o que denota a capacidade da planta em restringir o acúmulo desses

íons tóxicos nas folhas (ABREU *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2008; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2008). Embora existam alguns estudos relacionados com a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce e com a mobilização de suas reservas (MARQUES, 2007; VOIGT, 2009), o conhecimento desses processos é limitado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições gerais de semeadura

O presente experimento foi conduzido em casa de vegetação e as análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. Castanhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) anão-precoce, clone BRS 189, obtidas da EMBRAPA Agroindústria Tropical, depois de selecionadas, foram tratadas com o fungicida tiofanato-metílico [Metiltiofan[®] (Uberaba, Minas Gerais, Brasil)] a 0,09% por 10 min e, em seguida, exaustivamente lavadas com água destilada, para retirar os resíduos do fungicida.

A semeadura foi realizada em bandejas de plástico (25,0 cm x 25,0 cm x 11,0 cm) revestidas com papel alumínio, contendo vermiculita umedecida, na proporção de 2:1 (v/v), com água destilada (tratamento controle) ou com soluções de NaCl de condutividade elétrica (C.E.) de 6,0; 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹ (tratamentos salinos). As castanhas foram semeadas em covas de 2,0 cm de diâmetro por 4,5 cm de profundidade, espaçadas de 2,5 cm entre linhas e dentro das linhas e com o ponto de inserção castanha/pedúnculo voltado para cima (CAVALCANTI JUNIOR, 1994). No dia inicial do experimento, cada bandeja, contendo 20 castanhas, teve sua massa anotada, para que, diariamente, a água perdida por evapotranspiração fosse repostada. Os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar durante o período experimental, registrados com o auxílio de um termohigrógrafo, foram, respectivamente, $29,5 \pm 0,33^{\circ}\text{C}$ e $69,5 \pm 2,98\%$.

2.2. Coleta do material vegetal

Além do ED 0, foram selecionados para este estudo mais três ED da plântula de cajueiro anão-precoce (CAVALCANTI JUNIOR, 1994), a saber: ED 2 (emersão da radícula), ED 4 (emergência do solo) e ED 8 (plântula estabelecida) (Figura 1). No decorrer do

experimento, foram coletadas cinco plântulas de cada bandeja (repetição), à medida que estas alcançavam os respectivos ED em estudo, as quais foram separadas em cotilédones e eixo embrionário. O material coletado foi imediatamente armazenado a -20°C e após o congelamento, liofilizado. Depois da liofilização, foi determinada a massa seca dos cotilédones e do eixo embrionário, os quais, em seguida, foram macerados com o auxílio de um triturador de alimentos e de almofariz e pistilo, respectivamente. O pó liofilizado, assim obtido, foi armazenado a 4°C até posterior utilização.

2.3. Determinação das substâncias orgânicas e inorgânicas em cotilédones e eixo embrionário

2.3.1. Lipídios

Os teores de lipídios totais nos cotilédones de cada ED em estudo foram determinados por gravimetria, em duas extrações independentes. Em tubos de ensaio previamente pesados, foram adicionados cerca de 200 mg do pó liofilizado de cotilédones e 5,0 mL da mistura extratora, formada por clorofórmio (CHCl_3) e metanol (CH_3OH), na proporção de 2:1, respectivamente. Em seguida, esses tubos foram fechados e mantidos sob agitação constante, com o auxílio de uma mesa agitadora [Nova Ética[®], modelo 108/3 (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil)], com movimentos orbitais a 45 rpm. Decorrida 1 h, as amostras foram centrifugadas a $3.000 \times g$, por 5 min, à temperatura ambiente, e o sobrenadante, no qual os lipídios da amostra apresentavam-se dissolvidos, foi descartado. A extração foi repetida mais duas vezes, partindo-se do precipitado remanescente, sob as condições já descritas, à exceção do tempo de agitação, que foi reduzido para 30 min. Ao término do processo, os tubos contendo o precipitado final (cotilédones delipidados) foram deixados à temperatura ambiente por 24 h para que se processasse a completa volatilização da mistura extratora, e então, foi

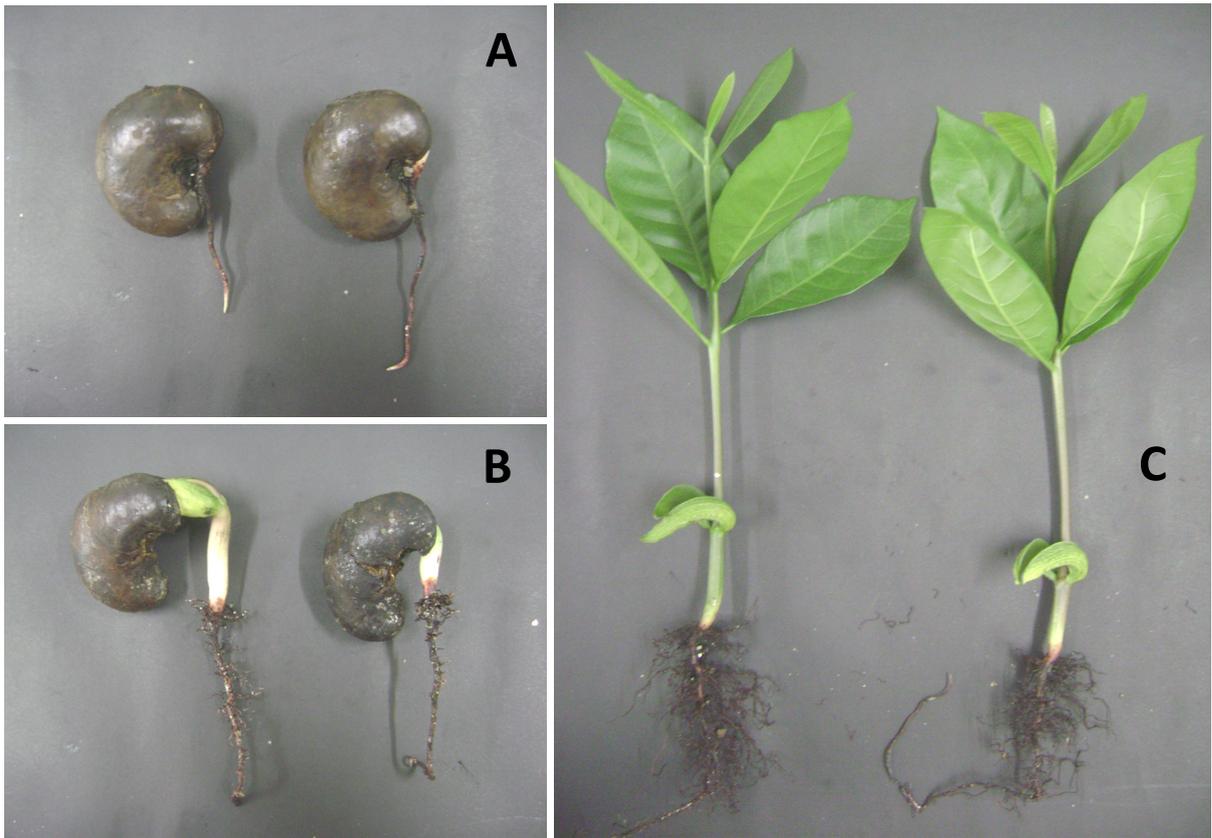


Figura 1. Estádios de desenvolvimento (ED) da plântula de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) anão-precoce: (A) ED 2; (B) ED 4 e (C) ED 8.

pesados até a obtenção de massas constantes. Cada amostra (repetição) foi analisada em triplicata. Os valores correspondentes aos teores de lipídios totais nos cotilédones foram obtidos através da diferença entre as massas inicial e final dos tubos e foram expressos em mg.Cot^{-1} .

2.3.2. Proteínas totais

Os teores de proteínas totais nos cotilédones de cada ED em estudo foram determinados segundo Baethgen e Alley (1989). Amostras de 50 mg de cotilédones delipidados (vide item anterior) foram colocadas em tubos digestores contendo 1,11 g da mistura catalisadora [sulfato de potássio (K_2SO_4), sulfato de zinco ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e selênio em pó (Se), na proporção de 1:0,1:0,01 (p/p)], juntamente com 2,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Em seguida, os tubos foram colocados em um bloco digestor [Marconi[®], modelo MA 4025 (Piracicaba, São Paulo, Brasil)], no qual a temperatura foi elevada gradualmente até 350°C , a fim de que se processasse a mineralização das amostras. Ao final desse processo, quando elas já se apresentavam como uma solução de cor verde e sem resíduos de material não-digerido, cada tubo teve seu conteúdo ressuspense em água desionizada, sendo o volume final aferido para 25 mL, em balão volumétrico. Em tubos de ensaio grandes, foi adicionado 1,0 mL da amostra convenientemente diluída com uma solução preparada pela dissolução de 22 g da mistura catalisadora utilizada na digestão em 1,0 L de H_2SO_4 a 1,1 M (solução diluente). Em seguida, foram adicionados 5,5 mL de uma solução formada por fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 0,1 M, tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 5% (p/v) e hidróxido de sódio (NaOH) a 5,4% (p/v); 4,0 mL de uma solução de salicilato de sódio ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$) a 15% (p/v) e nitroprussiato de sódio $\{\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}\}$ a 0,03% (p/v); e 2,0 mL de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,31% (v/v). O branco continha solução diluente ao invés de extrato. Após cada adição, os tubos

foram agitados, e ao final, mantidos em banho-maria a 37°C durante 15 min. Os teores de nitrogênio total foram estimados através de leituras de absorvância a 650 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de soluções com concentrações crescentes de sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄] [Vetec[®] (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil)]. Cada extrato (repetição) foi dosado em triplicata. Os teores de proteínas totais foram obtidos multiplicando-se o teor de N total por 6,25, levando-se em conta que nas proteínas o teor de N é, em média, 16% e resultados representam a média de duas extrações independentes para cada repetição, sendo expressos em mg.Cot⁻¹.

2.3.3. Carboidratos solúveis totais, redutores e não-redutores

Em tubos de ensaio contendo 50 mg do pó liofilizado de cotilédones ou do eixo embrionário, adicionaram-se 5 mL de etanol (C₂H₆O) a 80%, sendo em seguida mantidos a 75°C, em banho-maria, durante 1 h, com agitações a cada 15 min. Decorrido esse tempo, o material foi centrifugado a 3.000 x g, por 15 min, à temperatura ambiente, e o sobrenadante obtido foi coletado. A extração foi repetida mais duas vezes, partindo-se do precipitado remanescente, sob as condições já descritas, à exceção do tempo de extração, que foi reduzido para 30 min. Todos os sobrenadantes coletados foram reunidos e tiveram seu volume completado para 25 mL com etanol a 80% (v/v), em balão volumétrico, sendo em seguida armazenados a -25°C, até sua posterior utilização, enquanto o precipitado final foi reservado para a extração do amido. Os carboidratos solúveis totais foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). A 0,5 mL do extrato bruto, convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL de fenol (C₆H₆O) a 5% (v/v) e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 10 min, para o seu resfriamento. Em seguida, as amostras foram submetidas à quantificação dos carboidratos solúveis totais, por meio de leituras de absorvância em 490 nm, utilizando-se como branco, água desionizada (em

substituição ao extrato), fenol a 5% e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. A curva padrão de carboidratos solúveis totais foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de D(+) glicose anidra [Vetec[®] (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil)]. Cada extrato foi dosado em triplicata.

Os carboidratos redutores foram determinados de acordo com Miller (1959). Em tubos de ensaio contendo 1,5 mL do extrato convenientemente diluído, foram adicionados 1,5 mL da solução reagente DNS, formada por ácido 3,5-dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇) a 1% (p/v), NaOH a 1% (p/v), fenol a 0,2% (v/v) e sulfito de sódio (Na₂SO₃) a 0,05% (p/v). Após essa adição, os tubos foram imediatamente agitados, e mantidos a 85°C, em banho-maria, por 15 min. Decorrido esse tempo, os tubos foram retirados do banho-maria e foi adicionado 0,5 mL de uma solução de tartarato de sódio e potássio a 40%, antes que esfriassem, e em seguida, agitados. Após o resfriamento, as amostras foram submetidas à quantificação dos carboidratos redutores, por meio de leituras de absorbância em 575 nm, utilizando-se como branco, água desionizada (em substituição ao extrato) e os demais componentes do meio de reação. A curva padrão de carboidratos redutores foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de D(+) glicose anidra [Vetec[®] (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil)]. Cada extrato foi dosado em triplicata. Os carboidratos não-redutores foram determinados pela diferença entre os carboidratos solúveis totais e os redutores. Os teores de carboidratos solúveis totais, redutores e não-redutores obtidos representam a média de duas extrações independentes para cada repetição, sendo expressos em mg.Cot⁻¹ ou mg.eixo⁻¹, conforme o caso.

2.3.4. Amido

A extração e determinação do amido dos cotilédones foram realizadas como descrito em Hodge e Hofreiter (1962). No precipitado remanescente da extração de carboidratos

solúveis totais, foram adicionados 6,0 mL de ácido perclórico (HClO_4) a 30% (v/v), sendo os tubos mantidos sob agitação constante, por 20 min, com o auxílio de uma mesa agitadora [Nova Ética[®], modelo 108/3 (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil)], com movimentos orbitais a 45 rpm,. Logo após, foram adicionados 5 mL de água desionizada em cada um dos tubos, seguido por centrifugação a $3.000 \times g$, por 15 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi submetido a mais duas extrações, como descrito acima. Ao final das extrações, os sobrenadantes foram reunidos e tiveram seu volume completado para 50 mL com ácido perclórico a 6,9% (v/v), em balão volumétrico. Para a determinação do amido, foram adicionados em tubos de ensaio, 1 mL do extrato convenientemente diluído e 5,0 mL de uma solução de antrona ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$) a 0,14% (p/v), preparada em H_2SO_4 a 14 M. Os tubos foram mantidos a 95°C , em banho-maria, por 10 min. Decorrido esse tempo, a reação foi parada pela colocação dos tubos em banho de gelo (aproximadamente 2°C). Após atingirem a temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à quantificação dos carboidratos solúveis nelas presentes (devido à hidrólise perclórica do amido) por meio de leituras de absorbância em 620 nm, utilizando-se como branco, água desionizada (em substituição ao extrato) e antrona a 0,14%. A curva padrão de carboidratos foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de D(+) glicose anidra [Vetec[®] (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil)]. Cada extrato foi dosado em triplicata. Os teores de amido obtidos representam a média de duas extrações independentes para cada repetição, sendo expressos em mg.Cot^{-1} .

2.3.5. Aminoácidos livres

Os teores de aminoácidos livres nos cotilédones e eixo embrionário, em cada ED em estudo, foram determinados de acordo com o método de Yemm e Cocking (1955), utilizando-se o extrato preparado na extração de carboidratos solúveis. Em tubos de ensaio, foram

adicionados 0,5 mL do extrato bruto, convenientemente diluído; 0,25 mL de tampão citrato a 0,2 M, pH 5,0; 0,5 mL de cianeto de potássio (KCN) a 0,2 mM, em metilcelosolve ($C_3H_8O_2$) a 100% (v/v); e 0,1 mL de ninhidrina a 5% (p/v), em metilcelosolve a 100% (v/v). Em seguida, os tubos foram fechados, agitados e mantidos a 95°C, em banho-maria, durante 20 min. A reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo (2°C), nos quais foram adicionados 0,65 mL de etanol a 60% (v/v). Os teores de aminoácidos livres foram estimados através de leituras de absorvância em 570 nm, tomando-se como branco, água desionizada (em substituição ao extrato) e os demais constituintes do meio de reação. A curva padrão foi ajustada a partir de soluções com concentrações crescentes de glicina [Vetec[®] (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil)]. Cada extrato foi dosado em triplicata. Os teores de aminoácidos livres obtidos representam a média de duas extrações independentes para cada repetição, sendo expressos em $mg.Cot^{-1}$ ou $mg.eixo^{-1}$, conforme o caso.

2.3.6. Íons Na^+ , K^+ e Cl^-

Em tubos de ensaio contendo 100 mg do pó liofilizado de cotilédones ou eixo embrionário, foram adicionados 10 mL de água desionizada, sendo os tubos mantidos a 45°C, em banho-maria, durante 1 h, com agitações a cada 15 min. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 3.000 x g, por 15 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e armazenado a -25°C até sua utilização, sendo o precipitado descartado. Os teores de Na^+ e K^+ foram determinados segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1989), com o auxílio de um fotômetro de chama [Micronal[®], modelo B462 (São Paulo, São Paulo, Brasil)]. Os teores de Cl^- foram determinados segundo Gaines, Parker e Gascho (1984). Em tubos de ensaio, foram adicionados 3,0 mL do extrato bruto convenientemente diluído e 0,5 mL da mistura de reação, formada por tiocianato de mercúrio [$Hg(SCN)_2$] a 13,2 mM preparado em metanol a 100% e nitrato férrico [$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$] a 20,2% (p/v), em água desionizada, na

proporção de 4:1. Após agitação, os tubos permaneceram em repouso por 15 min, sendo os teores de Cl^- estimados através de leituras de absorvância em 460 nm, utilizando-se como branco, água desionizada (em substituição ao extrato) e a mistura de reação. Para a construção da curva padrão, foram utilizadas soluções com concentrações crescentes de NaCl [Vetec[®] (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil)]. Cada extrato foi dosado em triplicata. Os teores de íons Na^+ , Cl^- e K^+ foram expressos em mg.Cot^{-1} ou mg.eixo^{-1} , conforme o caso.

2.4. Atividades enzimáticas em cotilédones

Todos os ensaios enzimáticos foram precedidos de testes preliminares para assegurar a linearidade entre a atividade enzimática e o tempo de reação e/ou volume do extrato (enzima).

2.4.1. Enzimas do metabolismo dos lipídios

2.4.1.1 Extração

Para obtenção do extrato utilizado para a determinação da atividade das enzimas do metabolismo de lipídios, 100 mg do pó liofilizado de cotilédones foi homogeneizado em almofariz e pistilo, a 4°C, durante 4 min, com 2,0 mL de tampão de extração contendo Tris-HCl a 100 mM, pH 7,5, cloreto de potássio (KCl) a 10 mM, cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 1 mM, EDTA a 1 mM, glicerol a 20% (v/v), ditioneitol [DTT, ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$)] a 2 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 1 mM, à exceção dos extratos para a atividade da lipase e sintase do malato, em cujo tampão de extração o PMSF e o DTT, respectivamente, estiveram ausentes. Após completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante obtido (extrato bruto) foi imediatamente utilizado nos ensaios enzimáticos.

2.4.1.2. Lipase (E.C. 3.1.1.3)

A atividade lipásica foi determinada de acordo com Winkler e Stuckmann (1979), com modificações sugeridas por Gupta, Rathi e Gupta (2002). O meio de reação foi composto por 0,1 mL do extrato bruto e 2,4 mL de uma mistura recém-preparada das seguintes soluções, na proporção de 1:9:0,2, respectivamente: i) solução tampão Tris-HCl a 55 mM, pH 8,0, contendo goma arábica a 0,23% (p/v) e desoxicolato de sódio a 0,11% (p/v); ii) palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) a 0,3% (p/v), preparada em isopropanol a 100% (v/v); e iii) TRITON X-100 a 100% (v/v). A reação foi iniciada pela adição do extrato bruto e as amostras foram incubadas a 37°C, em banho-maria, durante 15 min. Decorrido esse tempo, a reação foi parada em banho de gelo (aproximadamente 2°C) e a concentração do *p*-nitrofenol liberado a partir da hidrólise enzimática do *p*NPP foi determinada pela absorbância em 410 nm, tomando-se como branco, água desionizada e os demais constituintes do meio de reação, mantidos sob as mesmas condições já citadas. Cada extrato enzimático foi dosado em duplicata. A atividade lipásica total foi expressa em $\mu\text{mol de } p\text{-nitrofenol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Cot}^{-1}$ e a atividade específica, em $\mu\text{mol de } p\text{-nitrofenol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Prot}^{-1}$, usando-se para os cálculos, o coeficiente de extinção molar ($1,5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) do *p*-nitrofenol (SADEGHIPOUR; BHATLA, 2002).

2.4.1.3. Liase do isocitrato (E.C. 4.1.3.1)

A atividade da liase do isocitrato (ICL, do inglês, *isocitrate lyase*) foi determinada espectrofotometricamente, através do aumento da absorbância em 324 nm, devido à formação de glioxalato de fenilhidrazona, de acordo com o método descrito por Dixon e Kornberg (1959), com pequenas modificações. O meio de reação foi composto por tampão imidazol-HCl a 100 mM, pH 7,1, MgCl₂ a 5 mM, cloridrato de fenilhidrazina (C₆H₈N₂.HCl) a 3,33 mM, cloridrato de cisteína (C₃H₇NO₂S.HCl) a 2 mM, isocitrato de sódio a 1,67 mM e 100 μL do extrato bruto, em um volume final de 1,0 mL. A reação foi conduzida à temperatura ambiente (25°C), sendo iniciada pela adição do isocitrato de sódio. As leituras inicial e final

foram feitas após 15'' e 5'15'' de reação, respectivamente. Cada extrato enzimático foi dosado em duplicata. A atividade total da ICL foi expressa em $\text{nmol glioxalato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Cot}^{-1}$ e a atividade específica, em $\text{nmol glioxalato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot}^{-1}$, usando-se para os cálculos, o coeficiente de extinção molar ($1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) do glioxalato de fenilhidrazona (DIXON; KORNBERG, 1959).

2.4.1.4. Sintase do malato (E.C. 2.3.3.9)

A atividade da sintase do malato (MS, do inglês, *malate synthase*) foi determinada medindo-se o aumento da absorbância em 412 nm, devido à reação entre o DTNB [ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-dibenzóico, ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$)] e o grupo tiol livre da coenzima-A (CoA), de acordo com o método descrito por Hock e Beevers (1966), com pequenas modificações. O meio de reação foi composto por tampão imidazol-HCl a 100 mM, pH 7,1, MgCl_2 a 5 mM, DTNB a 0,13 mM, acetil-CoA a 0,1 mM, glioxalato de sódio ($\text{C}_2\text{HO}_3\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 3,33 mM e 100 μL do extrato bruto, em um volume final de 10,0 mL. A reação foi conduzida à temperatura ambiente (25°C), sendo iniciada pela adição do glioxalato de sódio. As leituras inicial e final foram feitas após 15'' e 2'15'' de reação, respectivamente. Cada extrato enzimático foi dosado em duplicata. A atividade total da MS foi expressa em $\text{nmol de CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Cot}^{-1}$ e a atividade específica, em $\text{pmol de CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot}^{-1}$, usando-se para os cálculos, o coeficiente de extinção molar ($1,33 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) do complexo DTNB-CoA (HOCK; BEEVERS, 1966).

2.4.2. Enzimas do metabolismo de amido

2.4.2.1. Extração

Para obtenção do extrato utilizado para a determinação da atividade da enzima sintase do amido, 50 mg do pó liofilizado de cotilédones foi homogeneizado em almofariz e pistilo, a

4°C, durante 4 min, com 1,0 mL do mesmo tampão utilizado na extração da ICL. Já para a determinação da atividade das enzimas ($\alpha+\beta$)-amilase e fosforilase do amido, os extratos foram obtidos após a homogeneização de 100 mg do pó liofilizado de cotilédones em almofariz e pistilo, sob as condições anteriormente mencionadas, com 2,0 mL de tampão de extração, composto por Bis-Tris a 100 mM, pH 6,5, $MgCl_2$ a 3 mM, cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) a 3 mM, glicerol a 20% (v/v), TRITON X-100 a 1% (v/v), DTT a 2 mM e PMSF a 1 mM (SAEED; DUKE, 1990). Após completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante obtido (ambas as extrações) foi dessalinizado em colunas de Sephadex G-25, as quais foram equilibradas com 25 mL do respectivo tampão de extração. Após a aplicação das amostras, as frações foram coletadas a cada 1 mL e a atividade enzimática foi determinada na fração correspondente à maior concentração protéica (quarta fração), as quais foram eluídas pela adição do respectivo tampão de extração. Os extratos obtidos após dessalinização foram imediatamente utilizados nos ensaios enzimáticos.

2.4.2.2. Sintase do amido (E.C. 2.4.1.21)

A atividade da sintase do amido (SS, do inglês, *starch synthase*) foi determinada espectrofotometricamente, segundo Brown e Huber (1988), medindo a redução da absorvância a 340 nm, em um ensaio acoplado à oxidação do NADH pela enzima desidrogenase do lactato (o piruvato utilizado nessa reação foi produzido pela ação da enzima quinase do piruvato sobre o fosfoenolpiruvato). O meio de reação foi composto por Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0, $MgCl_2$ a 2 mM, EDTA a 1 mM, KCl a 5 mM, NADH a 0,2 mM, amido solúvel a 1% (p/v), fosfoenolpiruvato de potássio a 0,4 mM, pirofosfato (PP_i) a 20 mM, desidrogenase do lactato [(E.C. 1.1.1.27), proveniente de músculo de coelho] a 2 U.mL⁻¹, quinase do piruvato [(E.C. 2.7.1.40), proveniente de músculo de coelho] a 16 U.mL⁻¹, ADP-glicose a 5 mM e 50 μ L do extrato dessalinizado, em um volume total de 700 μ L. A reação foi

iniciada pela adição de ADP-glicose e ocorreu à temperatura ambiente. As leituras inicial e final foram feitas após 15" e 2'15" de reação, respectivamente. Cada extrato enzimático foi dosado em duplicata. A atividade total da SS foi expressa em $\mu\text{mol de NAD}^+ \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Cot}^{-1}$ e a atividade específica, em $\text{nmol de NAD}^+ \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot}^{-1}$, usando-se para os cálculos, o coeficiente de extinção molar ($6,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) do NAD (WALKER *et al.*, 1999).

2.4.2.3. ($\alpha+\beta$)-Amilase (E.C. 3.2.1.1 e E.C. 3.2.1.2)

A atividade amilásica total foi determinada segundo Guglielminetti *et al.* (1995). O meio de reação foi composto por tampão acetato a 50 mM, pH 5,2, CaCl_2 a 10 mM, amido solúvel a 1% (p/v) e 100 μL do extrato dessalinizado, em um volume total de 1,0 mL. A reação foi conduzida a 30°C, em banho-maria, sendo iniciada pela adição do extrato dessalinizado. Após 30 min, a reação foi parada pela adição de 1,0 mL da solução reagente DNS e os carboidratos redutores liberados foram quantificados conforme Miller (1959) [ver item 2.3.3.], através de leituras de absorbância em 575 nm, utilizando-se como branco amostras em que o extrato dessalinizado foi adicionado após o reagente DNS. A curva padrão foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de maltose [Merck® (Darmstadt, Hessen, Alemanha)]. Cada extrato enzimático foi dosado em duplicata. A atividade amilásica total foi expressa em $\mu\text{mol de maltose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Cot}^{-1}$ e a atividade específica, em $\mu\text{mol de maltose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot}^{-1}$.

2.4.2.4. Fosforilase do amido (E.C. 2.4.1.1)

A atividade da fosforilase do amido foi determinada colorimetricamente, segundo Lee (1966), através da determinação do fosfato inorgânico (P_i) liberado a partir da glicose-1-fosfato, em razão da adição de glicose à molécula de amido existente no meio de reação. Este, por sua vez, foi composto por MES a 100 mM, pH 6,3, amido solúvel a 1% (p/v), glicose-1-fosfato a 10 mM e 100 μL do extrato dessalinizado, em um volume total de 1,0 mL. A reação

foi iniciada pela adição de glicose-1-fosfato e as amostras foram incubadas a 30°C, em banho-maria, durante 30 min. Decorrido esse tempo, a reação foi parada pela adição de 0,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 5% (p/v). Em seguida, foram adicionados 2 mL de uma solução de acetato de sódio a 100 mM, a fim de elevar o pH para cerca de 4, evitando, assim, a hidrólise de glicose-1-fosfato em baixos valores de pH. O P_i resultante foi determinado como descrito por Fiske e Subbarow (1925). Em tubos de ensaio contendo 0,5 mL das amostras, foi adicionado 1,0 mL de uma solução formada por molibdato de amônio $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ a 0,7% (p/v) e H_2SO_4 a 2% (v/v), seguido pela adição imediata de 50 μ L de uma solução de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) a 10% (p/v). Após 10 min, foram adicionados 1,45 mL de uma solução formada por citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) a 2% (p/v), arsenito de sódio ($NaAsO_2$) a 2% (p/v) e ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$) a 2% (v/v). Após 30 min, as amostras foram submetidas à quantificação do P_i através de leituras de absorbância em 820 nm, utilizando-se como branco, amostras em que a glicose-1-fosfato foi adicionada após o TCA. A curva padrão de fosfato foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de ácido fosfórico [Vetec[®] (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil)]. Cada extrato enzimático foi dosado em duplicata. A atividade total da fosforilase do amido foi expressa em μ mol de $P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Cot}^{-1}$ e a atividade específica, em μ mol de $P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot}^{-1}$.

2.4.3. Concentração de proteína

A concentração de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos foi determinada de acordo com Bradford (1976). Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 μ L do extrato convenientemente diluído, seguido pela adição de 1,0 mL do reagente composto por azul de coomassie brilhante G-250 a 0,01% (p/v), etanol a 4,75% (v/v) e ácido fosfórico (H_3PO_4) a 8,5%. Após 15 min, a concentração de proteínas solúveis foi estimada pela leitura de

absorbância em 595 nm, tomando-se como branco, água desionizada (em substituição ao extrato) e o reagente. A curva padrão foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de albumina séria bovina (BSA) [Sigma[®] (Saint Louis, Missouri, EUA)]. Cada extrato enzimático foi dosado em triplicata.

2.5. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento formado por cinco repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para observar a significância das diferenças entre os estádios de desenvolvimento (ED) e os níveis de salinidade, de acordo com o teste *F* de Snedecor. Quando houve interação significativa, procedeu-se a comparação dos valores médios através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nas análises feitas com o material oriundo de cotilédones (substâncias orgânicas, inorgânicas e atividades enzimáticas), realizou-se o teste de Dunnett, para avaliar a significância das diferenças entre o ED 0 (tomado como referência) e os demais ED e tratamentos. A ANOVA e os testes de comparações múltiplas foram feitos utilizando-se o programa SigmaStat[®] [versão 3.0, (SPSS, Inc.)], enquanto os gráficos foram gerados através do programa SigmaPlot[®] [versão 9.0, (SYSTAT Software, Inc.)].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, estudou-se a mobilização dos principais compostos de reserva da semente (lipídios, proteínas, amido) de cajueiro anão-precoce, durante a germinação e estabelecimento da plântula sob condições controle (água destilada) e sob três níveis de salinidade, em diferentes estádios de desenvolvimento (ED). As substâncias contidas nos cotilédones de castanhas quiescentes (ED 0) de cajueiro anão-precoce, clone BRS 189, foram, principalmente, lipídios (52,2%), proteínas (21,7%), carboidratos solúveis (11,7%) e amido (10,5%), sendo estas proporções tomadas com base na massa seca deste órgão (Figura 2). Esses resultados, salvo as devidas diferenças nas metodologias empregadas e nos materiais vegetais utilizados, foram corroborados pelos observados por Maia, Holanda e Martins (1971) e Souza-Filho *et al.* (1989), em que a maior parte das reservas da semente foi composta por lipídios, seguidos por proteínas e carboidratos.

Como pode ser observado na Figura 3, somente após o ED 4 é que a massa seca de cotilédones (MSC) foi reduzida significativamente. Os valores médios desse parâmetro em castanhas quiescentes (ED 0) e em plântulas no ED 2, ED 4 e ED 8 foram, respectivamente, 2,11; 2,10; 2,01 e 0,82 g.plântula⁻¹ (Figura 3). Essa redução observada entre o ED 4 e o ED 8 foi acompanhada por um aumento significativo na massa seca do eixo embrionário (MSEB) (Figura 4). De fato, a MSEB de plântulas no ED 8 foi, em média, 4,8 vezes superior àquela de plântulas no ED 4, ao passo que a MSEB destas últimas, foi apenas 1,2 vezes superior à das plântulas no ED 2 (Figura 4). Dessa forma, a etapa compreendida entre o ED 4 e o ED 8 foi a de maior depleção dos cotilédones e deveu-se à mobilização das reservas cotiledonares para o eixo embrionário em crescimento. Os efeitos da salinidade sobre a MSC e a MSEB foram visíveis apenas em plântulas no ED 8 (Figuras 3 e 4), havendo uma inibição na depleção das reservas cotiledonares em plântulas crescidas a 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹, em comparação às

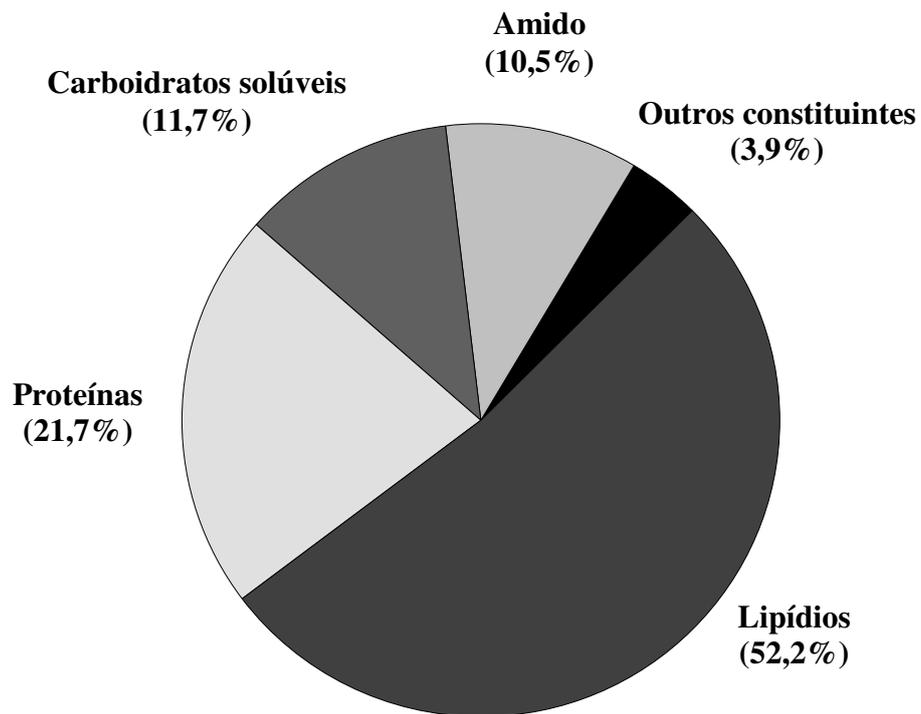


Figura 2. Composição química dos cotilédones de sementes quiescentes (ED 0) do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce.

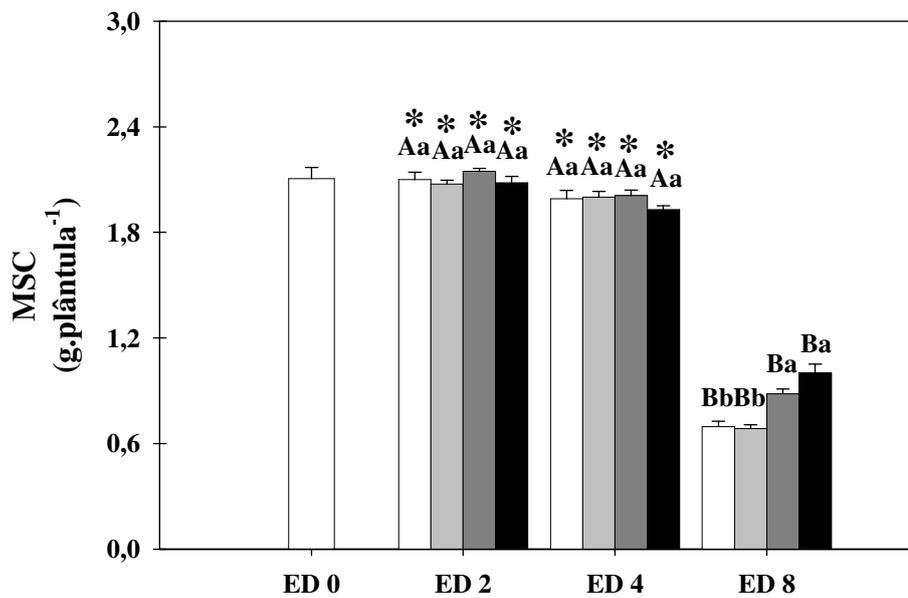


Figura 3. Massa seca dos cotilédones (MSC) de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (◻), 12,0 (◼) ou 18,0 (■) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

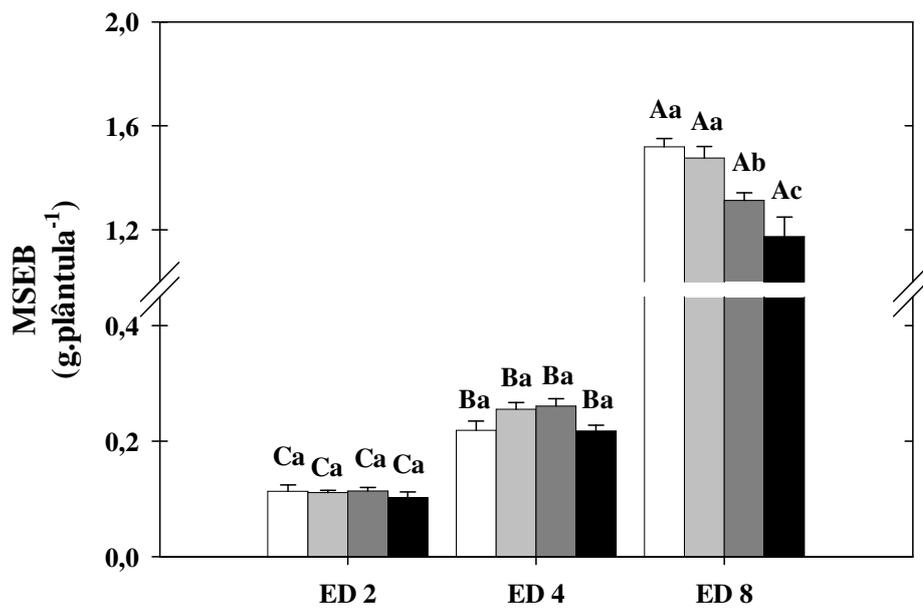


Figura 4. Massa seca do eixo embrionário (MSEB) de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (◻), 12,0 (◼) ou 18,0 (◼) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

plântulas do controle, o que resultou em um crescimento menos pronunciado do eixo embrionário. Porém, as plântulas crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$ foram as mais afetadas (Figura 4).

A redução na MSC concomitantemente ao aumento na MSEB é um comportamento típico de espécies que possuem cotilédones carnosos, com grandes quantidades de reservas, cuja função principal é suprir o crescimento do eixo embrionário; eles não adquirem capacidade fotossintética e senescem quando a plântula torna-se estabelecida (BEWLEY; BLACK, 1994; KITAJIMA, 1996; FENNER; THOMPSON, 2005). Além do cajueiro (*A. occidentale*), amendoim (*Arachis hypogaea*) e feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) são exemplos de espécies em que isso também ocorre.

Efeitos inibitórios da salinidade sobre a depleção das reservas contidas na semente e o crescimento do eixo embrionário foram observados em outro clone de cajueiro anão-precoce (VOIGT *et al.*, 2009), assim como em outras espécies, tais como feijão-de-corda (GOMES-FILHO; PRISCO, 1978; PRISCO; ENÉAS-FILHO; GOMES-FILHO, 1981; GOMES-FILHO *et al.*, 1983), lentilha (CORCHETE; GUERRA, 1986), girassol (ASHRAF; ZAFAR; ASHRAF, 2003) e trigo (SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006). De modo geral, esses autores concluíram que a redução no crescimento da plântula, imposta pelo estresse salino, resultou, principalmente, da inibição na mobilização das reservas. A observação de que o ED 8 é mais afetado pelo estresse salino do que os ED 2 e 4 já havia sido relatada anteriormente (MARQUES, 2007), em cujo estudo foi observado que o estresse salino não reduziu a percentagem de plântulas que alcançaram esses dois ED, mas retardou isso, enquanto que a percentagem de plântulas que alcançaram o ED 8 foi severamente reduzida, especialmente a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$. Isso está de acordo com a conclusão sustentada por Prisco (1987) e Hosseini, Powell e Bingham (2002) de que em glicófitas, o estabelecimento da plântula é mais afetado pelo estresse salino do que a germinação.

A mobilização lipídica iniciou-se apenas após a emergência da radícula (ED 2), sendo mais proeminente entre o ED 4 e o ED 8 (Figura 5). As reservas lipídicas contidas nos cotilédones de plântulas no ED 8 representaram, em média, apenas 17,2% do total contido na semente quiescente (ED 0) (Figura 5). O estresse salino inibiu a mobilização lipídica em cotilédones de plântulas nos ED 4 e 8. Seus efeitos foram mais conspícuos nas plântulas no ED 8 crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$, sendo os teores de lipídios nos cotilédones de tais plântulas quase o dobro daqueles apresentados pelas plântulas dos demais tratamentos, nesse mesmo ED (Figura 5).

Tendo em vista que os lipídios representam a maior fração das substâncias de reserva dos cotilédones e que eles são intensamente mobilizados desde a emergência da radícula, pode-se afirmar que a mobilização de tais compostos é imprescindível para que a plântula de cajueiro anão-precoce se estabeleça com sucesso. Nagaraja (1987) observou que os lipídios neutros, tais como os triacilgliceróis, compunham 96% da fração lipídica das sementes da variedade comum de cajueiro, sendo o restante formado por glicolipídios e fosfolipídios. Quando se estudou a composição de ácidos graxos da semente, observou-se que os insaturados perfaziam mais de 80% do total, sendo representados, principalmente, pelos ácidos graxos oléico (18:1; 63,6%) e linoléico (18:2; 17,1%) (MAIA; STULL, 1977).

O estresse salino também inibiu a mobilização lipídica em outras plantas, entre as quais, linho (*Linum usitatissimum*), algodoeiro (*Gossypium barbadense*) e mamona (*R. comunis*) (YOUNIS; HASANEEM; NEMET-ALLA, 1987), duas espécies do gênero *Medicago* (MILED-DAOUD; CHERIF, 1991) e girassol (ASHRAF; ZAFAR; ASHRAF, 2003). Em geral, tais efeitos foram atribuídos a alterações na atividade das enzimas envolvidas na mobilização desses compostos. Kayani, Naqvi e Ting (1990) também relataram a inibição da mobilização lipídica durante a germinação de jojoba (*Simmondsia chinensis*) em

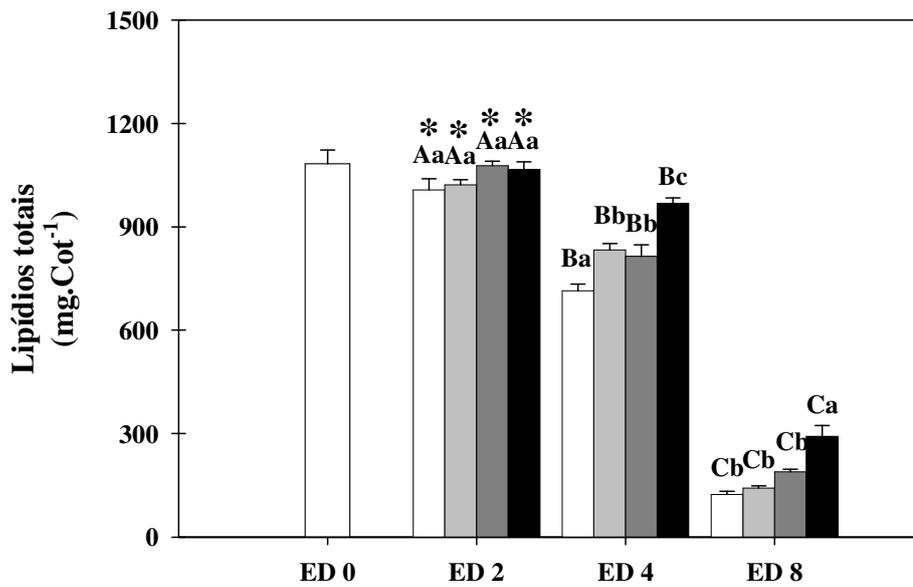


Figura 5. Teores de lipídios totais de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] ou salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (◻), 12,0 (◼) ou 18,0 (■) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

condições de salinidade e tal fato correlacionou-se positivamente com a inibição do crescimento do eixo embrionário e com a redução nos teores de carboidratos solúveis dos cotilédones. Embora nessa espécie as reservas lipídicas sejam formadas por ceras — ácidos graxos de cadeia longa esterificados a álcoois de cadeia longa (NELSON; COX, 2006) — onde perfazem cerca de 50% da massa seca da semente, a sua mobilização também envolve a β -oxidação dos ácidos graxos, o ciclo do glioxalato e a gluconeogênese, como observado por Moreau e Huang (1977).

A mobilização protéica em cotilédones de plântulas de cajueiro anão-precoce tornou-se evidente a partir do ED 2, e semelhantemente ao que ocorreu com a mobilização dos lipídios, foi mais pronunciada entre o ED 4 e o ED 8 (Figura 6A). Os teores de proteínas nos cotilédones de plântulas no ED 8 representaram, em média, 28,4% do total contido em cotilédones da semente quiescente (ED 0) (Figura 6A). No entanto, é provável que esse processo tenha se iniciado antes mesmo da emergência da radícula (ED 2), visto que houve um aumento significativo nos teores de aminoácidos livres nos cotilédones de plântulas no ED 2, quando comparados aos do ED 0 (Figura 6B). Sendo assim, a aparente inalterabilidade entre os teores de proteínas em cotilédones de sementes quiescentes (ED 0) e os de plântulas no ED 2 (Figura 6A) pode ser explicada por uma taxa de proteólise proporcional à de síntese. Outro ponto que deve ser considerado é que a ativação de algumas enzimas proteolíticas envolve o corte de fragmentos da proteína, os quais são posteriormente hidrolisados a aminoácidos livres. Embora em uma extensão menor, a mobilização de ácidos nucléicos pode também aumentar a fração N-aminossolúvel das células pela liberação das bases nitrogenadas, as quais podem ter sido quantificadas como aminoácidos livres. Mesmo assim, os teores de aminoácidos livres pareceram ser regulados pela taxa de proteólise e/ou pelo dreno exercido pelo eixo embrionário em crescimento (Figura 6B).

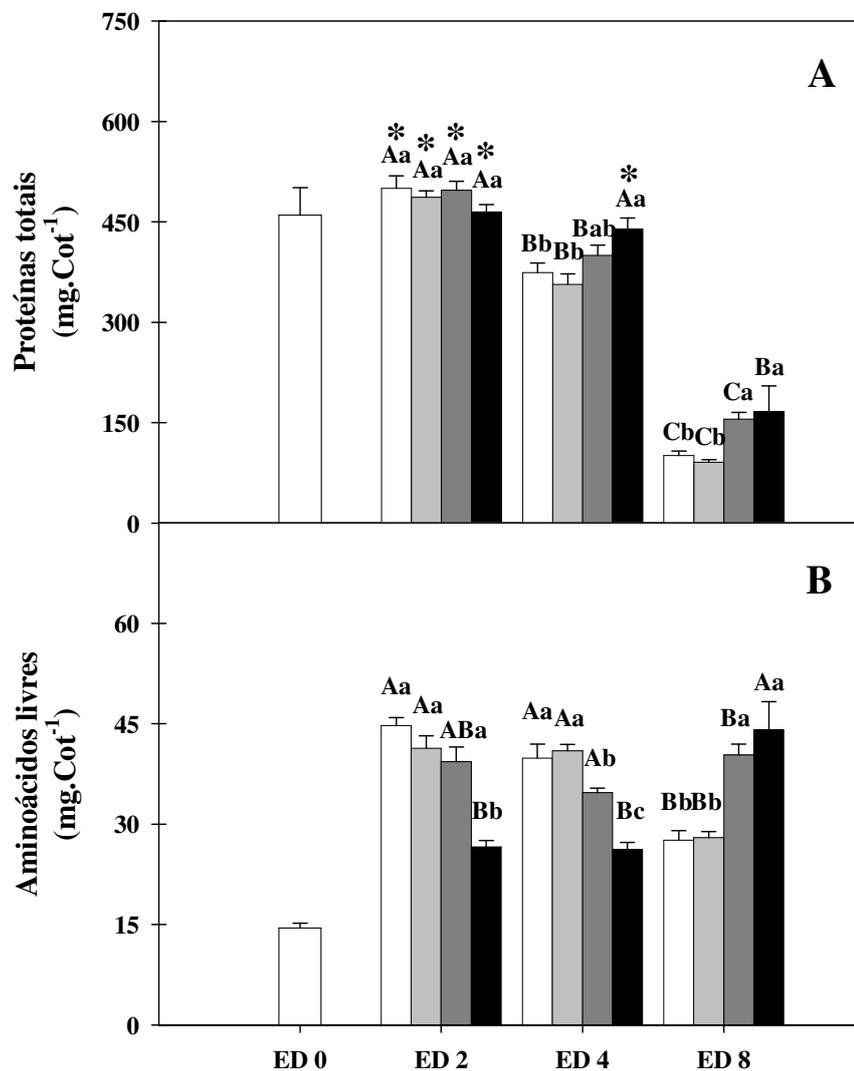


Figura 6. Teores de proteínas totais (A) e de aminoácidos livres (B) de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (◻), 12,0 (◼) ou 18,0 (◼) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

A salinidade afetou a mobilização de proteínas nos cotilédones das plântulas de cajueiro anão-precoce, sendo seus efeitos inibitórios sobre esse processo mais evidentes em plântulas no ED 8 e crescidas a 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹, mas parecem ter atuado tão logo a mobilização tenha sido iniciada (Figura 6A). Tal afirmação se baseia no fato de que os teores de aminoácidos livres nos cotilédones das plântulas nos ED 2 e 4 terem sido reduzidos significativamente, em comparação aos do controle, à medida que a concentração de sais do meio aumentou (Figura 6B). Em contrapartida, houve um acúmulo de aminoácidos nos cotilédones das plântulas no ED 8 crescidas a 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹ e tal fato pode ter sido uma das razões pelas quais a mobilização de proteínas foi inibida (Figura 6B).

Prisco e Vieira (1976) observaram inibição da atividade proteásica em cotilédones de plântulas de feijão-de-corda, durante a germinação em condições salinas (NaCl a 100 mM), que foi acompanhada pelo acúmulo de aminoácidos livres nesses órgãos, indicando que o transporte desses compostos para o eixo embrionário também foi afetado. Segundo esses autores, este último fato explicaria a inibição da atividade proteásica, porque seus produtos finais (aminoácidos) agiriam como sinalizadores em potencial, regulando a taxa de hidrólise das proteínas por *feedback* negativo. Por analogia ao que foi relatado por Prisco e Vieira (1976), em feijão-de-corda, e com base nos resultados aqui apresentados, supõe-se que esse mesmo mecanismo regulatório tenha atuado nos cotilédones das plântulas de cajueiro anão-precoce no ED 8, resultando na redução da proteólise. A principal fração protéica nos cotilédones de cajueiro anão-precoce é formada por globulinas (VOIGT *et al.*, 2009) e a hidrólise dessas reservas é mediada, principalmente por proteases serínicas, conforme constatado por Ponte (2007).

Os teores de aminoácidos livres no eixo embrionário das plântulas de cajueiro anão-precoce também aumentaram consideravelmente ao longo do desenvolvimento (Figura 7). Os maiores aumentos nesses valores foram encontrados entre o ED 4 e o ED 8, que coincidiram

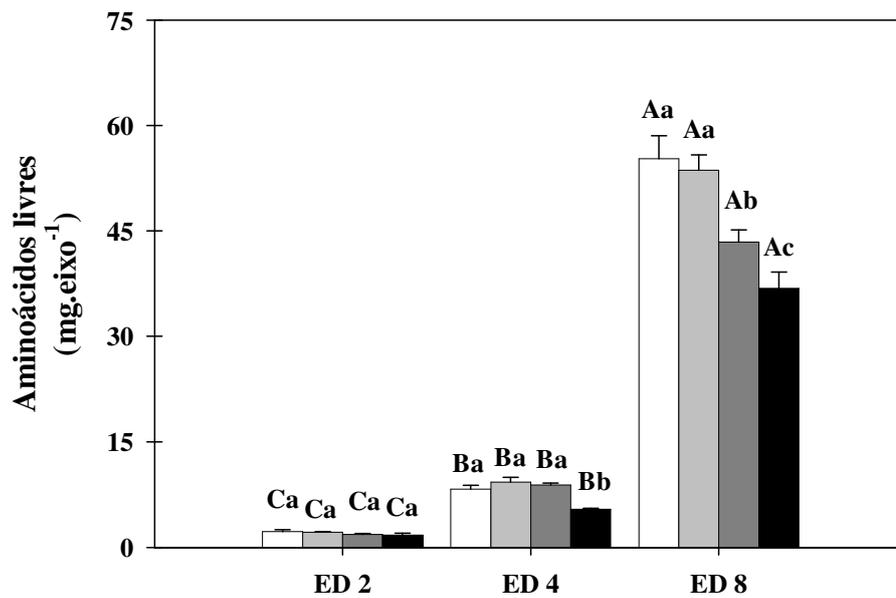


Figura 7. Teores de aminoácidos livres no eixo embrionário de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (◻), 12,0 (◼) ou 18,0 (■) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

com a maior taxa de mobilização das proteínas cotiledonares (Figuras 6). De modo geral, os teores de aminoácidos livres nas plântulas no ED 8 foram, em média, 4,9 vezes superiores àqueles de plântulas no ED 4; estas últimas, por sua vez, apresentaram teores de aminoácidos livres 3,0 vezes superiores aos das plântulas no ED 2 (Figura 7). Entretanto, os teores desses compostos foram significativamente reduzidos pela salinidade, especialmente nas plântulas no ED 4 e ED 8 crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$ (Figura 7).

O aumento observado nos teores de aminoácidos livres no eixo embrionário, durante o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce, decorreu, principalmente, do transporte dos aminoácidos resultantes da mobilização de reservas protéicas dos cotilédones. Esses compostos são utilizados para a síntese *de novo* de várias proteínas no próprio eixo embrionário, não se descartando a possibilidade deles serem respirados, gerando, assim, esqueletos de carbono (BEWLEY; BLACK, 1994). No entanto, a salinidade causou uma redução no acúmulo de aminoácidos livres no eixo embrionário, em especial nas plântulas no ED 8 crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$. É provável que isso tenha sido resultado de uma menor demanda do eixo embrionário por esses compostos, tendo em vista que nessas plântulas houve um acúmulo de aminoácidos livres nos cotilédones (Figura 6B) acompanhado pela inibição da mobilização protéica nesses órgãos (Figura 6A).

Como pode ser observado na Figura 8, houve um acúmulo transiente de amido durante a germinação e estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce. Os maiores teores de amido foram observados em cotilédones de plântulas no ED 4 e somente após esse ED é que se observou sua mobilização de forma mais intensa, resultando em teores de amido equivalentes ou superiores aos encontrados inicialmente em cotilédones de sementes quiescentes (ED 0) (Figura 8). Porém, esse processo foi severamente afetado pelo estresse salino. Em plântulas nos ED 2 e 4, a fase de acúmulo do amido foi inibida com o aumento da salinidade, enquanto que nas plântulas no ED 8, a fase afetada foi a de mobilização do amido

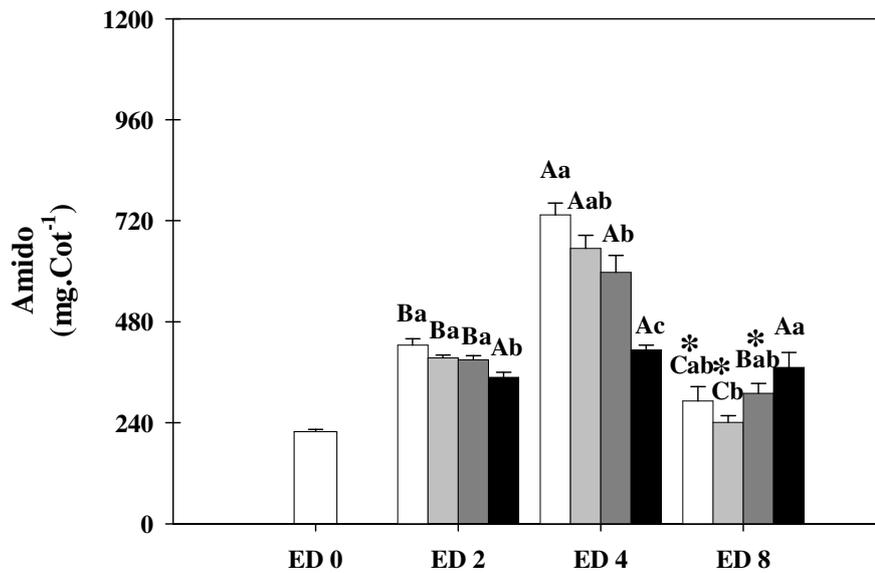


Figura 8. Teores de amido em cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (◻), 12,0 (◼) ou 18,0 (◼) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer ED em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

acumulado (Figura 8). Esses efeitos inibitórios foram mais conspícuos em plântulas crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$, que não foram capazes de acumular quantidades de amido comparáveis àquelas de plântulas do controle.

O acúmulo transiente de amido nos cotilédones de plântulas de cajueiro anão-precoce já havia sido relatado anteriormente (VOIGT *et al.*, 2009) e também em outras espécies, tais como soja (ADAMS; RINNE; FJERSTAD, 1980; BROWN; HUBER, 1988), pepineiro (CHAPMAN; GALLESCHI, 1985), *Trigonella foenumgraecum* (BEWLEY *et al.*, 1993) e *Juglans regia* (CHENEVARD; FROSSARD; LACOINTE, 1994). Tal comportamento pode ser explicado de duas maneiras: i) a síntese de amido pode funcionar como um dreno interno por carboidratos solúveis, o que permitiria a conversão adequada de lipídios a carboidratos e preveniria prováveis efeitos osmóticos em função das altas concentrações de carboidratos solúveis; ou ii) esse acúmulo poderia relacionar-se a uma saturação na capacidade de utilização desses compostos pelo eixo em crescimento, sem haver um *feedback* negativo deste processo sobre a gliconeogênese (CHENEVARD; FROSSARD; LACOINTE, 1994). Além do papel evidente na mobilização de lipídios, níveis elevados de carboidratos solúveis também podem inibir a mobilização protéica (BOREK; RATAJCZAK, 2002).

Em cajueiro anão-precoce, as duas alternativas apresentadas por Chenevard, Frossard e Lacoïnte (1994) parecem plausíveis. Como observado anteriormente (Figura 5), o início da mobilização de lipídios ocorreu logo após a emersão da radícula (ED 2). Assim, a síntese de amido parece ser uma estratégia adequada para garantir a continuidade da mobilização de reservas ao evitar o acúmulo excessivo de carboidratos solúveis, visto que a demanda do eixo embrionário ainda é relativamente reduzida. Em etapas posteriores ao ED 4, quando o eixo embrionário torna-se, então, um dreno mais forte, o amido acumulado é mobilizado.

Os estudos acerca dos efeitos da salinidade sobre o metabolismo do amido nos tecidos de reserva das sementes têm se concentrado, em sua maioria, na etapa de degradação desse composto, em detrimento da etapa de síntese. Mas, por analogia ao que acontece em outros órgãos, a inibição da síntese do amido ocorrida nos cotilédones de plântulas de cajueiro anão-precoce sob estresse salino deve ter sido ocasionada pela redução da atividade das enzimas envolvidas nesse processo. Chen, Chen e Wang (2008) observaram que os teores de amido em folhas de plântulas de arroz foram bastante reduzidos quando as plântulas foram submetidas à salinidade, sem haver, contudo, alterações significativas na eficiência fotossintética e na atividade das enzimas de degradação desse composto. Dessa forma, eles sugeriram que a etapa de síntese do amido é que estaria sendo afetada e isso foi comprovado pelos níveis reduzidos da atividade e expressão das enzimas-chave desse processo — fosforilase da ADP-glicose e sintase do amido — em plântulas submetidas à salinidade (CHEN; CHEN; WANG, 2008). Por outro lado, há vários relatos de que o processo de degradação das reservas amiláceas, nos cotilédones ou endosperma, é afetado pela salinidade (PRISCO; ENÉAS-FILHO; GOMES-FILHO, 1981; KAUR; GUPTA; KAUR, 1998, 2003; SILVA, 2008), e isso, em geral, está correlacionado à inibição ou retardamento da germinação e do crescimento do eixo embrionário.

A variação nos teores de carboidratos solúveis (reduzores e não-reduzores) cotiledonares durante a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce em condições de salinidade está apresentada na Figura 9. Como se pode constatar, quase a totalidade dos carboidratos solúveis presentes nos cotilédones de sementes quiescentes (ED 0) foi constituída por carboidratos não-reduzores (95% do total) (Figura 9A e 9C). Houve uma redução drástica nos teores de carboidratos solúveis entre o ED 0 e o ED 2, que se deveu ao consumo de carboidratos não-reduzores (Figuras 9A e 9C). Entre o ED 2 e o ED 4, o comportamento observado foi diferente. Os teores de carboidratos solúveis nos cotilédones de

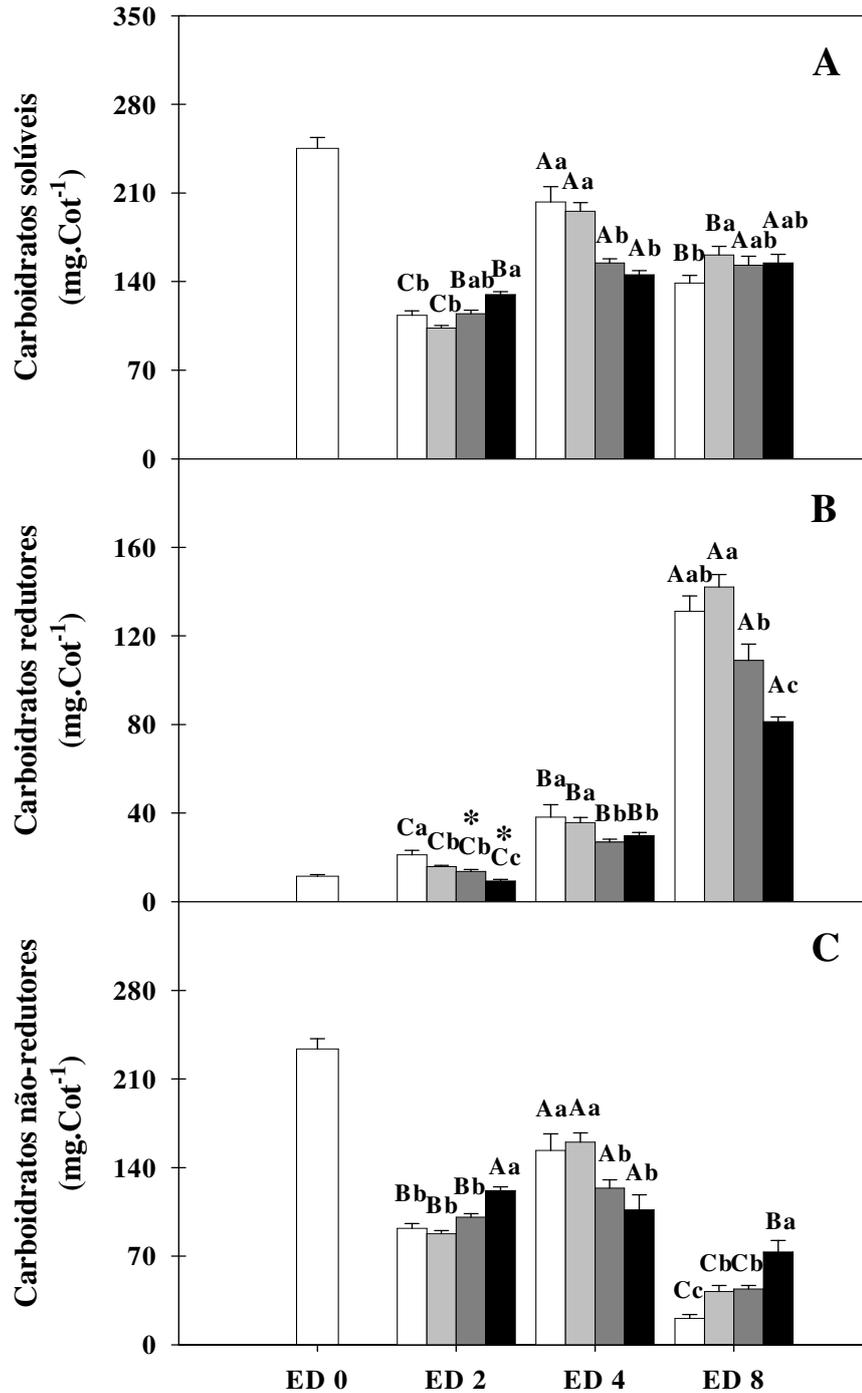


Figura 9. Teores de carboidratos solúveis (A), redutores (B) e não-redutores (C) em cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (◻), 12,0 (◼) ou 18,0 (◼◼) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

plântulas no ED 4 foram cerca de 50% maiores que aqueles de plântulas no ED 2 e esse aumento foi dirigido tanto pelos carboidratos redutores quanto pelos não-redutores (Figura 9). Por fim, entre o ED 4 e o ED 8, os teores médios dos carboidratos solúveis permaneceram praticamente inalterados, contudo, nos cotilédones das plântulas no ED 8, houve uma redução expressiva nos teores de carboidratos não-redutores, que foi contrabalançada pelo aumento nos teores de carboidratos redutores (Figura 9).

A salinidade afetou negativamente a variação nos teores de carboidratos solúveis (redutores e não-redutores) nos cotilédones de cajueiro anão-precoce. No ED 8 houve inibição no acúmulo de carboidratos redutores nesses órgãos, sendo proporcional à concentração de sais no meio, sendo isso mais evidente nas plântulas crescidas a 18 dS.m⁻¹ (Figura 9B). No que diz respeito aos carboidratos não-redutores, estes efeitos inibitórios também estiveram presentes, mas atuaram de maneira diferente em cada ED. No ED 2, a salinidade resultou em um acúmulo dos carboidratos não-redutores nos cotilédones das plântulas crescidas a 18,0 dS.m⁻¹, porém no ED 4, houve uma redução nos teores desses carboidratos em cotilédones de plântulas crescidas a 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹ e, por fim, no ED 8, esses carboidratos se apresentaram com maiores teores, especialmente em plântulas crescidas a 18,0 dS.m⁻¹ (Figura 7C).

Monerri, Garcia-Luis e Guardiola (1986), ao analisarem a composição dos carboidratos solúveis contidos nos cotilédones de sementes quiescentes de ervilha (*P. sativum*), identificaram que a maior fração desses compostos correspondia à sacarose e aos oligossacarídeos da série rafínosica (carboidratos não-redutores). Isso também foi observado nas sementes de algodoeiro (DOMAN *et al.*, 1982) e até mesmo nas de espécies arbóreas, como o pau-brasil (BORGES *et al.*, 2006) e *Picea glauca*, uma conífera (DOWNIE; BEWLEY, 2000). De um modo geral, esses compostos foram os primeiros a serem utilizados, suprimindo o crescimento do embrião até que a germinação ocorresse. É provável que em

cajueiro anão-precoce aconteça o mesmo, visto a quantidade elevada de carboidratos não-redutores na semente quiescente (ED 0) e que essas substâncias foram as únicas a serem reduzidas entre o ED 0 e o ED 2 (Figura 9C), embora não se conheça a proporção exata da sacarose e dos oligossacarídeos da série rafínosica nas sementes dessa espécie. Além disso, parte dos produtos da hidrólise dos carboidratos não-redutores pode ter sido utilizada para a síntese transiente de amido, que se iniciou antes mesmo da emergência da radícula (Figura 8). Já entre o ED 2 e o ED 4, o processo que preponderou para que os teores de carboidratos não-redutores aumentassem, deve ter sido, provavelmente, a produção de carboidratos, em especial, a sacarose, como resultado da mobilização das reservas lipídicas (GRAHAM, 2008), pois nesse ínterim, cerca de 30% das reservas lipídicas já haviam sido mobilizadas, em condições controle (Figura 5).

O aumento ocorrido nos teores de carboidratos redutores cotiledonares durante a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce parece ter sido em função, inicialmente, da hidrólise dos carboidratos não-redutores (entre o ED 0 e o ED 2), sendo, posteriormente, dirigido por uma eventual degradação de amido, que já poderia estar ocorrendo nos cotilédones de plântulas no ED 4, mas que tornou-se evidente apenas entre o ED 4 e o ED 8 (Figuras 8 e 9B). O acúmulo desses carboidratos nos tecidos de reserva das sementes é dependente da taxa de degradação do amido, sendo um fato comum a várias espécies, tais como feijão-de-corda (PRISCO; ENÉAS-FILHO; GOMES-FILHO, 1981), *Macrotyloma uniflorum* (KARUNAGARAN; RAO, 1991) e algodoeiro (ASHRAF *et al.*, 2002).

Os efeitos da salinidade sobre os teores de carboidratos solúveis nos cotilédones de plântulas de cajueiro anão-precoce estiveram estritamente relacionados com os que foram observados sobre a mobilização dos lipídios e do amido. A mobilização lipídica foi inibida já no ED 4, principalmente em plântulas crescidas a 18 dS.m⁻¹ (Figura 5), o que deve ter sido

responsável, pelo menos em parte, pelas reduções observadas nos teores de carboidratos não-redutores nesse mesmo ED (Figura 9C). Em contrapartida, no ED 8, esses carboidratos acumularam-se na proporção em que a salinidade do meio aumentou. Isso se assemelhou ao que foi observado por Prisco, Enéas-Filho e Gomes-Filho (1981) em feijão de corda, que concluíram que a salinidade inibiu o transporte para o eixo embrionário dos produtos da degradação do amido. Assim, partindo-se dessa idéia, pode-se sugerir que o mesmo tenha acontecido neste estudo, atentando-se para o fato de que os carboidratos que se acumularam nos cotilédones de plântulas de cajueiro anão-precoce foram os não-redutores, entre os quais estaria, possivelmente, a sacarose resultante da mobilização lipídica. A diminuição nos teores de carboidratos redutores, por sua vez, esteve relacionada à inibição da síntese e degradação do amido, que ocorreu principalmente nas plântulas crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$.

Os teores de carboidratos solúveis (redutores e não-redutores) no eixo embrionário de plântulas de cajueiro anão-precoce aumentaram no decorrer do desenvolvimento e isso ocorreu de maneira similar tanto para os carboidratos não-redutores quanto para os redutores; estes últimos foram os que predominaram, em todos os ED estudados (Figura 10). Entre o ED 2 e o ED 4, houve um aumento significativo apenas nos teores de carboidratos redutores e isso resultou em aumentos nos níveis de carboidratos solúveis (Figuras 10A e 10B). Já entre o ED 4 e o ED 8, houve um aumento em ambos os tipos de carboidratos (redutores e não-redutores); nesse ínterim, os carboidratos não-redutores aumentaram 15,9 vezes, enquanto que os redutores, apenas 3,3 vezes (Figura 10). A salinidade também induziu mudanças nos teores de carboidratos solúveis no eixo embrionário e mais uma vez, as plântulas no ED 8 foram as mais afetadas (Figura 10). Nesse ED, houve uma redução significativa nos teores de carboidratos redutores e não-redutores do eixo embrionário, à medida que a salinidade do meio aumentou (Figuras 10B e 10C).

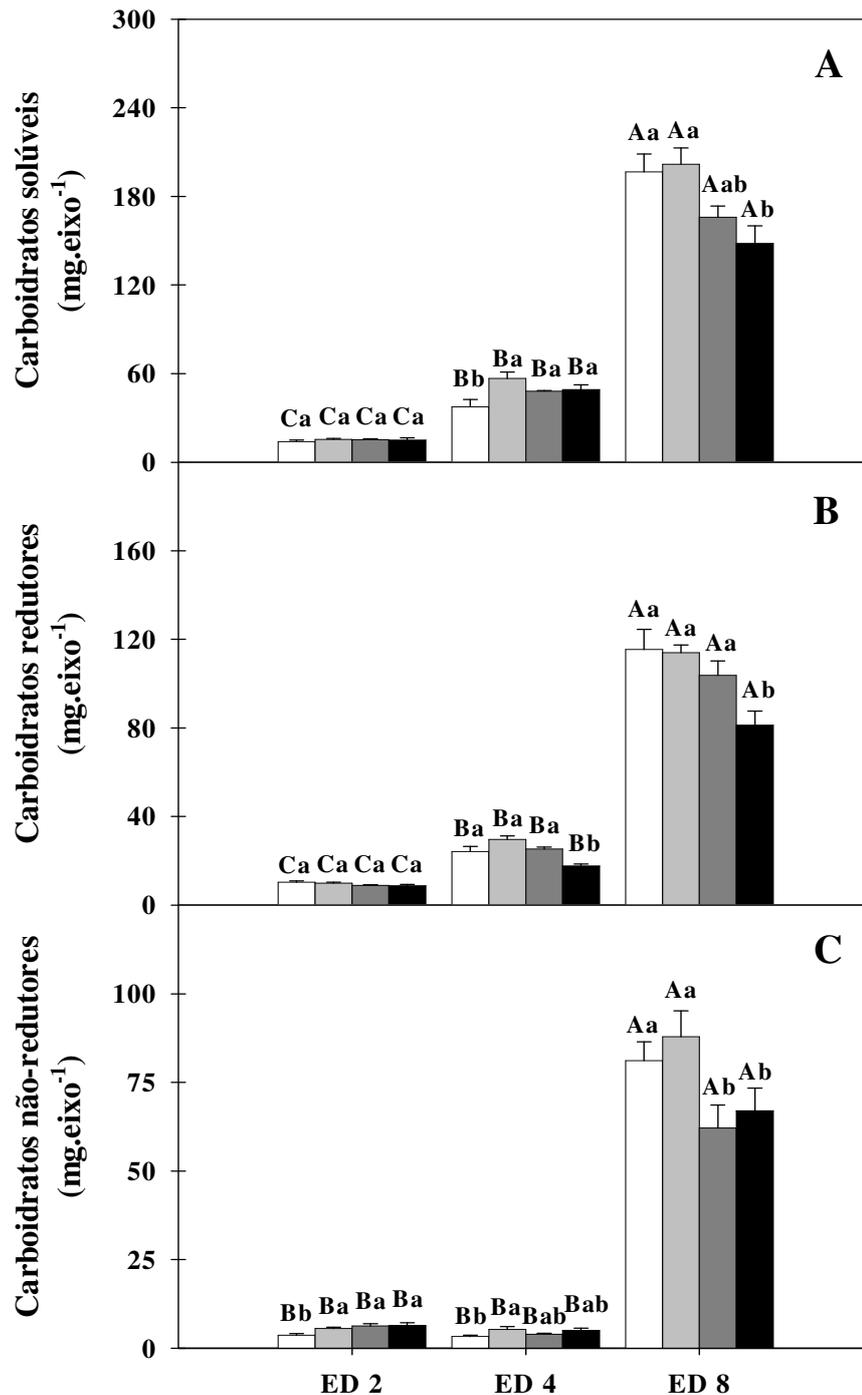


Figura 10. Teores de carboidratos solúveis (A), redutores (B) e não-redutores (C) no eixo embrionário de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (■), 12,0 (■) ou 18,0 (■) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

As variações ocorridas nos teores de carboidratos solúveis no eixo embrionário durante a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce estiveram relacionadas com as que ocorreram nos cotilédones. Como referido anteriormente, observou-se aumento nos teores de carboidratos não-redutores cotiledonares entre o ED 2 e o ED 4 (Figura 9C), como resultado, provavelmente, da produção de sacarose a partir da mobilização lipídica (Figuras 5); assim, é possível que o crescimento do eixo embrionário ocorrido nesse ínterim (Figura 4) tenha sido suprido pela sacarose transportada a partir dos cotilédones. A utilização da sacarose requer sua hidrólise a seus constituintes (glicose e frutose) e, dessa forma, sugere-se que os níveis aumentados de carboidratos redutores do eixo embrionário das plântulas no ED 4, em comparação aos das plântulas no ED 2, sejam conseqüência da maior degradação da sacarose nesses tecidos (Figura 10B). Nas plântulas no ED 8, os elevados teores de carboidratos não-redutores no eixo embrionário, quando comparados aos dos demais ED, são reflexo do aumento na MSEB e do contínuo transporte da sacarose a partir dos cotilédones, cuja degradação resultou no aumento dos teores de carboidratos redutores (Figura 10B e 10C).

Convém salientar que, nas plântulas no ED 8, parte dos carboidratos solúveis (redutores e não-redutores) pode ter sido produzida como conseqüência da fotossíntese, haja vista que essas plântulas já apresentavam folhas primárias completamente expandidas e folhas secundárias em processo de expansão (Figura 1). Entretanto, a MSC de tais plântulas ainda representavam, em média, cerca de 30% da MSC da semente quiescente (ED 0) (Figura 2), denotando que a mobilização de reservas ainda estava vigente.

As reduções causadas pela salinidade nos teores de carboidratos solúveis presentes no eixo embrionário das plântulas de cajueiro anão-precoce pareceram resultar, principalmente, da inibição do transporte da sacarose para o eixo embrionário e seu conseqüente acúmulo nos cotilédones (Figura 8). Assim, uma menor fração desse composto pôde ser utilizada no

crescimento da plântula, que acarretou uma redução nos teores de carboidratos redutores nesses tecidos (Figura 9B). Tal explicação é corroborada pelos resultados encontrados por Prisco, Enéas-Filho e Gomes-Filho (1981), em que foi observada uma redução drástica nos teores de carboidratos solúveis no eixo embrionário de plântulas de feijão-de-corda, quando germinadas em condições de salinidade (NaCl a 100 mM), e isso coincidiu com a inibição da mobilização do amido e com o acúmulo de carboidratos solúveis nos cotilédones.

Como pode ser observado nas Figuras 11 e 12, os teores dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- foram alterados significativamente, tanto nos cotilédones quanto no eixo embrionário, durante a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce. Nos cotilédones e em condições controle, houve uma tendência de diminuição nos teores dos íons analisados a partir das plântulas no ED 2, concomitante a um aumento gradual desses íons no eixo embrionário (Figuras 11 e 12). Já em condições de salinidade, os teores dos íons Na^+ e Cl^- elevaram-se expressivamente, tanto nos cotilédones quanto no eixo embrionário das plântulas, concomitante a uma tendência de acúmulo de K^+ nos cotilédones e de redução nos teores deste íon no eixo embrionário, durante o desenvolvimento da plântula (Figuras 11 e 12). As plântulas no ED 8 foram as que mais acumularam íons tóxicos (Na^+ e Cl^-), especialmente aquelas crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$. Os teores de Na^+ e Cl^- nos cotilédones dessas plântulas aumentaram, respectivamente, 176% e 841%, em relação às plântulas do controle (Figuras 11A e 11C), enquanto no eixo embrionário, os teores de Na^+ e Cl^- aumentaram, respectivamente, 28% e 107%, em relação às plântulas do controle (Figuras 12A e 12C).

A redução gradual nos teores dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- ao longo do desenvolvimento, que foi mais evidente nos cotilédones das plântulas do tratamento controle, parece resultar da transferência desses íons para o eixo embrionário, haja vista que ao final da etapa de estabelecimento da plântula, os cotilédones senescem e as reservas minerais contidas neles

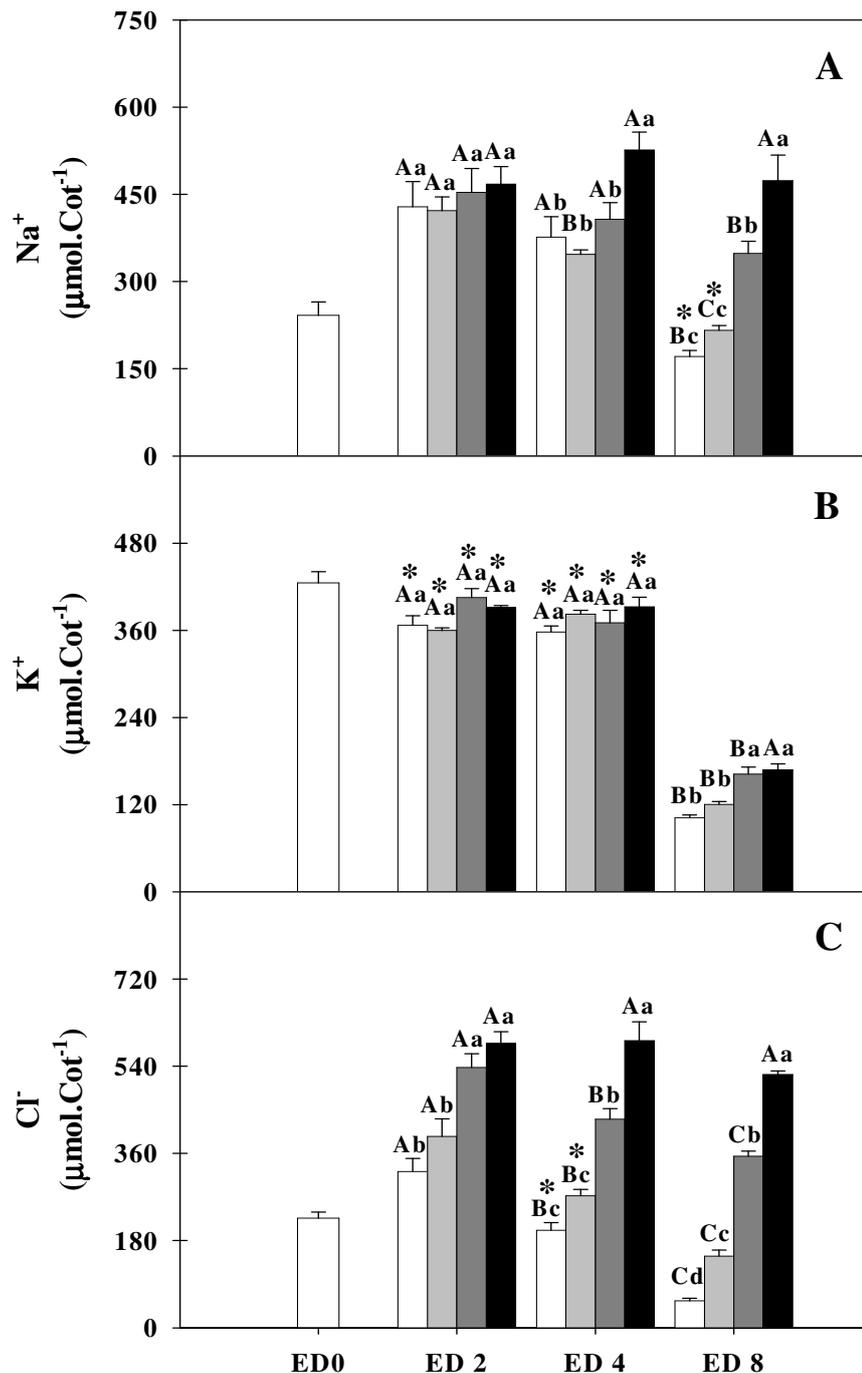


Figura 11. Teores dos íons Na^+ (A), K^+ (B) e Cl^- (C) em cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (◻), 12,0 (◼) ou 18,0 (◼) dS.m^{-1}]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

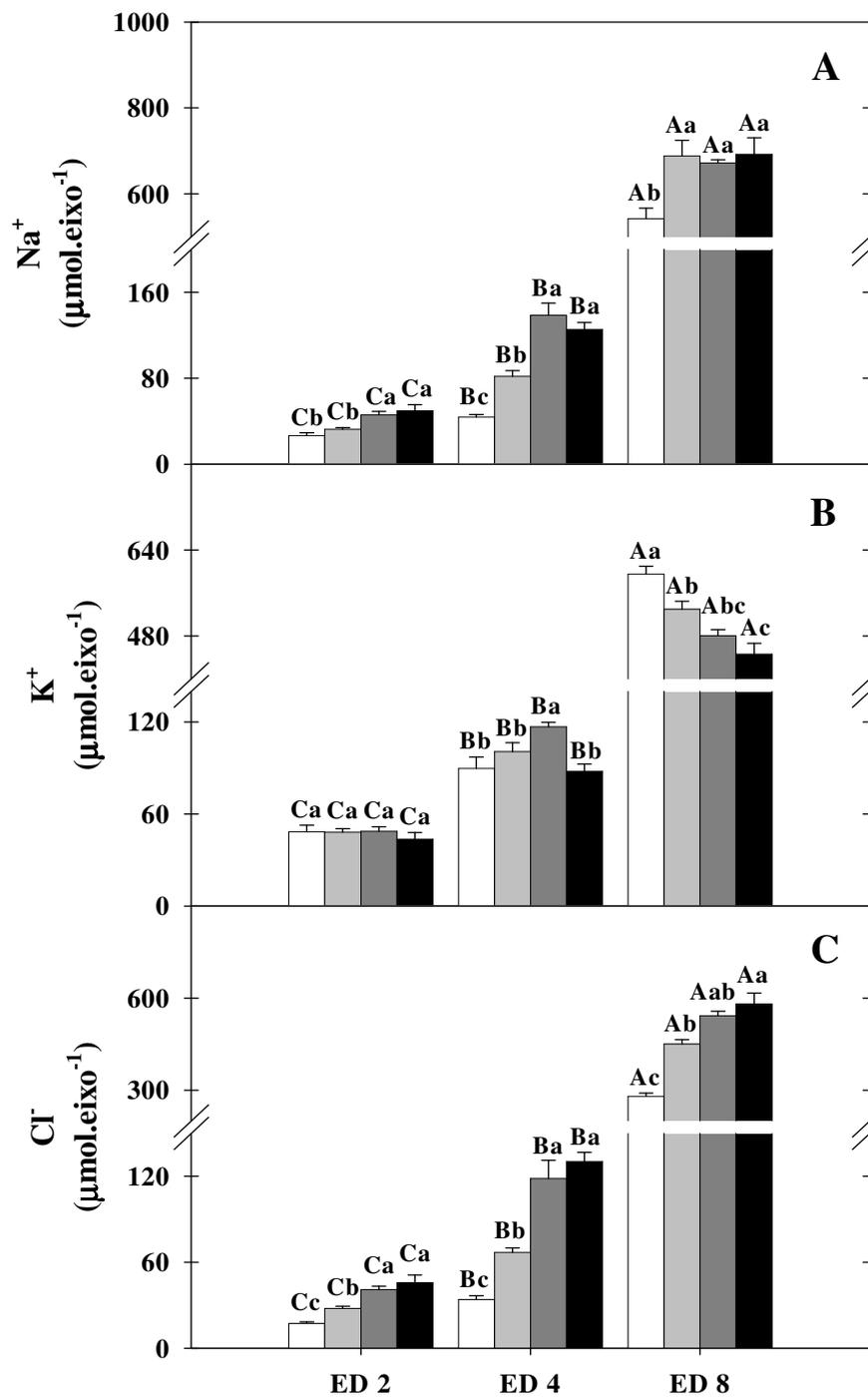


Figura 12. Teores dos íons Na^+ (A), K^+ (B) e Cl^- (C) no eixo embrionário de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [soluções de NaCl com condutividade elétrica de 6,0 (◻), 12,0 (◼) ou 18,0 (◼) dS.m^{-1}]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

devem ser reutilizadas pelo eixo embrionário. Por outro lado, os teores elevados dos íons Na^+ e Cl^- nas plântulas no ED 8 foram consequência, principalmente, de sua absorção pelas raízes.

Como já citado, os maiores teores dos íons Na^+ e Cl^- foram encontrados nas plântulas crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$ e tal fato correlacionou-se positivamente com a inibição da mobilização lipídica, protéica e amilácea ocorrida nos cotilédones dessas plântulas (Figuras 5, 6 e 8). Portanto, sugere-se que a inibição da mobilização de reservas pela salinidade durante o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce, foi decorrente, pelo menos em parte, dos elevados níveis de Na^+ e Cl^- nos seus cotilédones, que resultaram em efeitos tóxicos às células deste órgão. Adicionalmente, esses íons tóxicos também prejudicaram o crescimento da plântula (Figura 4), reduzindo o dreno exercido pelo eixo embrionário sobre os produtos da mobilização de reservas cotiledonares.

Ashraf, Zafar e Ashraf (2003) também observaram o acúmulo gradual dos íons Na^+ e Cl^- e a consequente redução do íon K^+ nos cotilédones e no hipocótilo de plântulas de girassol submetidas a concentrações crescentes de NaCl (0, 50, 100 e 150 mM), que estiveram relacionados à inibição da mobilização de reservas cotiledonares nessa espécie. Hosseini, Powell e Bingham (2002), por sua vez, estabeleceram que a redução no crescimento da plântula de soja, ocasionada pela salinidade, foi devida, principalmente, ao acúmulo excessivo do íon Na^+ . Este íon também esteve envolvido na indução dos sistemas antioxidativos enzimático e não-enzimático em plântulas de arroz submetidas à salinidade (TSAI *et al.*, 2004). Em cajueiro anão-precoce, entretanto, não se pôde precisar qual dos íons tóxicos (Na^+ ou Cl^-) foi o principal responsável pelos efeitos inibitórios da salinidade nessa espécie.

As variações na atividade lipásica total e específica nos cotilédones de plântulas de cajueiro anão-precoce estão mostradas na Figura 13. Como pode ser observado, a atividade lipásica total aumentou consideravelmente entre o ED 0 e o ED 2, porém, a partir do ED 2,

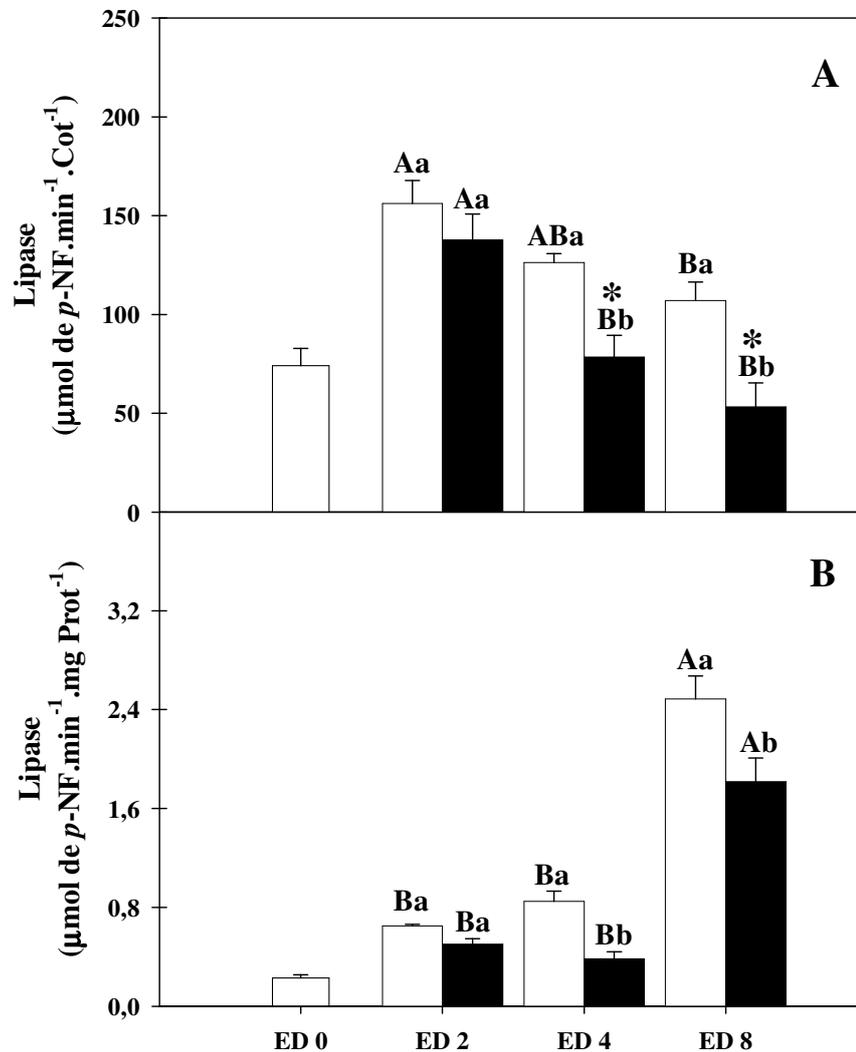


Figura 13. Atividade total (A) e específica (B) da lipase proveniente de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 (■) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

houve um decréscimo gradual na atividade total desta enzima (Figura 13A). Este comportamento foi observado tanto nos cotilédones das plântulas do controle, quanto naqueles das plântulas submetidas à salinidade (solução de NaCl a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$), porém, nestas últimas, e a partir do ED 4, a atividade lipásica total foi significativamente inferior àquela de cotilédones das plântulas do controle (Figura 13A). A atividade lipásica específica, por sua vez, manteve-se reduzida no ED 0, aumentando consideravelmente ao longo do desenvolvimento da plântula; nos cotilédones das plântulas no ED 8, houve um aumento de 8,4 vezes nesta atividade enzimática, em comparação àquela das sementes quiescentes (ED 0) (Figura 13B). Assim como na atividade total, a salinidade também reduziu a atividade lipásica específica, a partir do ED 4 (Figura 13B).

Como era de se esperar, a atividade total e específica da lipase e as variações nelas ocorridas, durante a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce, estiveram fortemente relacionadas com a mobilização lipídica. A etapa do desenvolvimento em que a mobilização lipídica foi mais intensa (entre o ED 4 e o ED 8) coincidiu com o maior aumento na atividade específica desta enzima (Figuras 5 e 13B). Esta relação também ocorreu durante a germinação de amendoim (ALLFREY; NORTHCOTE, 1977; HUANG; MOREAU, 1978), pepineiro (HUANG; MOREAU, 1978; DAVIES; CHAPMAN, 1979a) e girassol (HUANG; MOREAU, 1978; SADEGHIPOUR; BHATLA, 2002), além de outras espécies, tais como algodoeiro, milho e tomateiro (HUANG; MOREAU, 1978). Em condições de salinidade, a atividade lipásica foi severamente reduzida, o que justificou a inibição da mobilização lipídica ocorrida nos cotilédones das plântulas crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$, tanto no ED 4 quanto no ED 8 (Figuras 5 e 13). Isso foi devido, provavelmente, aos efeitos deletérios dos sais sobre a ativação e/ou a síntese *de novo* dessa enzima, haja vista que a atividade lipásica total nos cotilédones das plântulas do tratamento salino (nos ED 4 e 8) foi sempre menor que aquela apresentada pelas plântulas do controle (Figura 13B). A inibição da

atividade lipásica e da mobilização de reservas lipídicas, em razão do estresse salino, também foram reportadas durante a germinação de linho, algodoeiro e mamona (YOUNIS; HASANEEN; NEMET-ALLA, 1987) e *Brassica napus* (BEN-MILED; ZARROUK; CHÉRIF, 2000).

A atividade total e específica da enzima liase do isocitrato (ICL) está apresentada na Figura 14. Assim como aconteceu com a lipase, a atividade total da ICL aumentou significativamente entre o ED 0 e o ED 2, decrescendo gradativamente logo após esse ED (Figura 14A). Também houve um aumento na atividade específica da ICL entre o ED 0 e o ED 2, a qual manteve-se inalterada até o ED 4; entre o ED 4 e o ED 8, ela tornou a aumentar consideravelmente (Figura 14B). De modo surpreendente, as atividades total e específica da ICL nos cotilédones das plântulas de cajueiro anão-precoce não foram afetadas pela salinidade (Figura 14). As variações nas atividades total e específica da enzima sintase do malato (MS) seguiram o mesmo padrão observado para a ICL e mais uma vez, a salinidade não resultou em alterações significativas na sua atividade (Figura 15).

Sabe-se há bastante tempo que a atividade das enzimas-chave do ciclo do glicoxalato (ICL e MS) aumenta consideravelmente durante a germinação e o estabelecimento da plântula, especialmente em espécies cujas sementes possuem grandes quantidades de reservas lipídicas (BEEVERS, 1980; BEWLEY; BLACK, 1994). Rylott, Hooks e Graham (2001), ao estudarem a germinação e o estabelecimento da plântula de *Arabidopsis*, observaram que o aumento na atividade da ICL e da MS foi estritamente regulado na etapa de transcrição dos genes que codificam para essas enzimas. Ao final do processo de mobilização das reservas lipídicas, os genes da ICL e MS já não estavam mais sendo transcritos e a atividade dessas enzimas declinou (RYLOTT; HOOKS. GRAHAM, 2001). É possível que em cajueiro anão-precoce, a diminuição gradual na atividade total da ICL e da MS nos cotilédones aqui

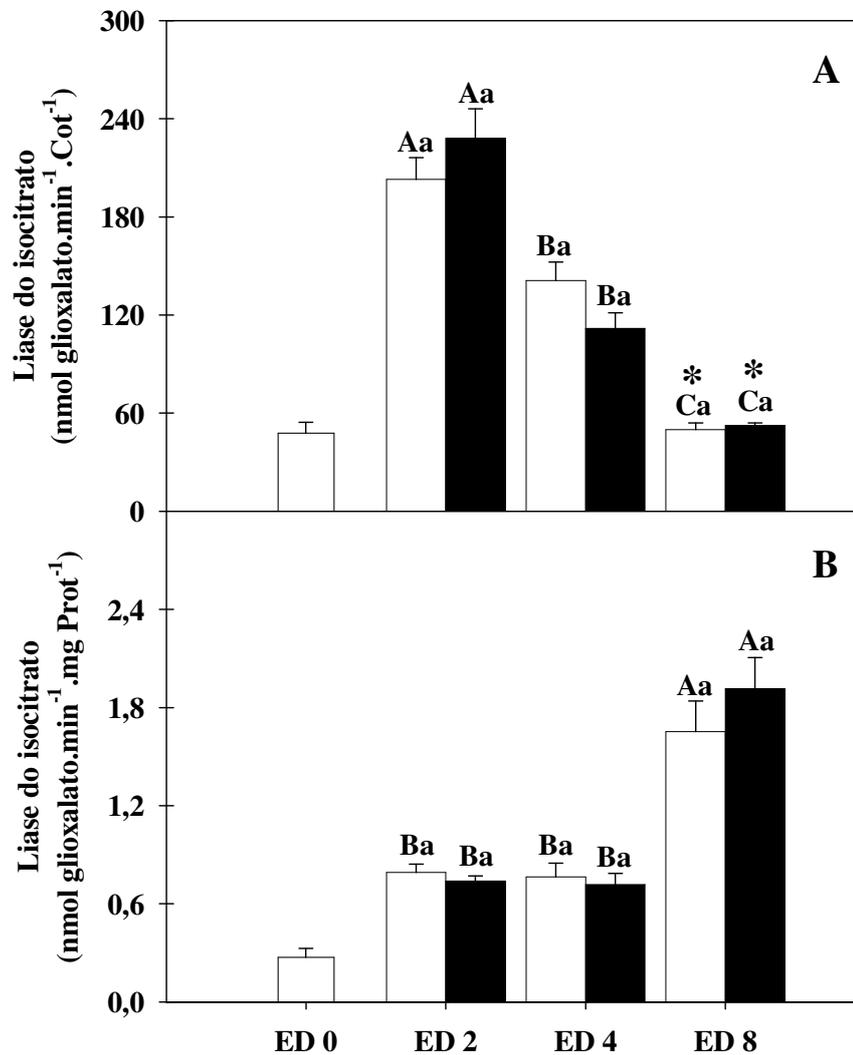


Figura 14. Atividade total (A) e específica (B) da liase do isocitrato proveniente de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 (■) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

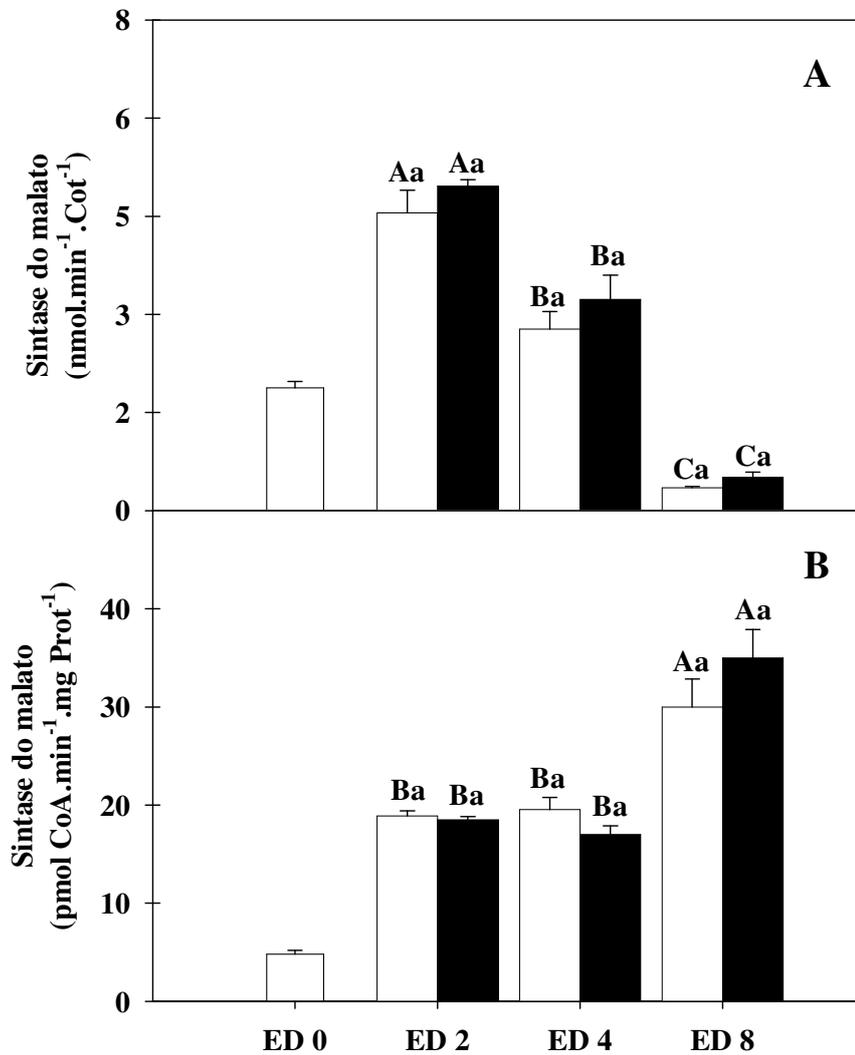


Figura 15. Atividade total (A) e específica (B) da sintase do malato proveniente de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 (■) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

observada também tenha sido devida à redução na quantidade (síntese) dessas enzimas ao longo do desenvolvimento da plântula.

Ao se avaliar a atividade total da ICL e da MS em condições controle e de salinidade, observou-se que, em ambos os casos, elas não foram afetadas pela salinidade (Figuras 14 e 15). Isso pode ter sido consequência da indução da expressão dos genes que codificam para essas enzimas, o que manteve as atividades total e específica nas condições de salinidade sempre equivalentes àsquelas do controle. Esta afirmação se baseia nos resultados obtidos por los Reyes, Myers e McGrath (2003), que avaliaram os efeitos de diferentes tipos de estresse abiótico, entre eles, a salinidade, sobre a germinação e o estabelecimento da plântula de dois genótipos de beterraba que apresentavam tolerância diferencial a esses estresses. Esses autores observaram que, quando submetidas à salinidade (NaCl a 150 mM), as plântulas do genótipo tolerante foram mais vigorosas, como resultado da melhor utilização das reservas da semente, embora tenha havido redução na expressão da α -amilase. Também, ao compararem a expressão dos genes da ICL e da MS de plântulas sob estresse salino com a de plântulas do controle, eles observaram aumento na atividade da ICL e da MS, sendo isto acompanhado pela indução da expressão de seus genes, o que levou os autores a concluir que esse aumento nas enzimas do ciclo do glicoxalato seria um mecanismo para compensar a redução no metabolismo dos carboidratos (LOS REYES; MYERS; McGRATH, 2003). Por analogia, sugere-se que a manutenção da atividade da ICL e da MS nos cotilédones das plântulas crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$ tenham tido a finalidade de utilizar adequadamente as reservas lipídicas, na tentativa de compensar a inibição do acúmulo transiente do amido ocorrida nos cotilédones dessas plântulas (Figura 6).

A Figura 16 apresenta as variações ocorridas nas atividades total e específica da enzima sintase do amido (SS) nos cotilédones, durante a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce. Houve um aumento significativo na atividade total da SS

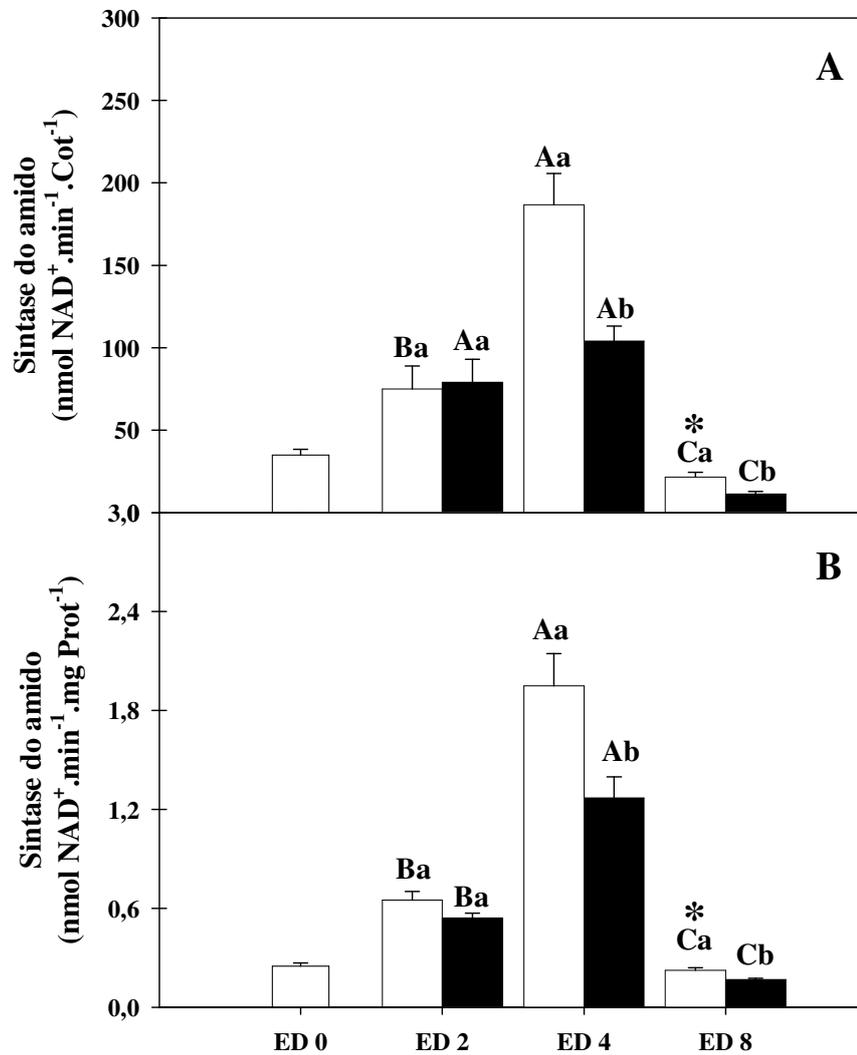


Figura 16. Atividade total (A) e específica (B) da sintase do amido proveniente de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 (■) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

entre o ED 0 e o ED 4, a qual declinou logo em seguida (Figura 16A), sendo comportamento similar observado para a atividade específica dessa enzima (Figura 16B). O estresse salino afetou a atividade da SS, porém, isso só ocorreu nas plântulas no ED 4 e ED 8, sendo observadas reduções, respectivamente, de 44% e 34%, para o caso das plântulas no ED 4 e de 40% e 23%, respectivamente, para as plântulas no ED 8 (Figura 16).

De modo previsível, o aumento na atividade da SS observado entre o ED 0 e o ED 4 coincidiu com a fase de acúmulo transiente de amido nos cotilédones (Figuras 8 e 16). Como já mencionado, o amido acumulado no ED 4, foi mobilizado, em grande parte, durante a etapa final do estabelecimento da plântula (ED 8). Esta relação direta entre o acúmulo transiente do amido e a atividade da SS também foi encontrada por outros autores (CHAPMAN; GALLESCHI, 1985; BROWN; HUBER, 1988). Como já visto, a salinidade reduziu a atividade da SS nos cotilédones de cajueiro anão-precoce, que se correlacionou com os menores teores de amido nos cotilédones das plântulas crescidas a $18,0 \text{ dS.m}^{-1}$, em relação ao controle (Figura 8 e 16). Há vários relatos de que a atividade de enzimas envolvidas na mobilização de reservas são inibidas pela salinidade. Por exemplo, a atividade da RNase de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda é fortemente reduzida quando as sementes germinam em condições de salinidade (NaCl a 100 mM) (GOMES-FILHO *et al.*, 1983; GOMES-FILHO; SODEK, 1988) e recentemente comprovou-se que essa inibição foi decorrente do retardamento da ativação (solubilização) dessa enzima (GOMES-FILHO *et al.*, 2008). Estudos sobre os efeitos específicos da salinidade sobre a atividade das enzimas envolvidas na síntese do amido são escassos, mas se especula que ajam inibindo a expressão dos seus respectivos genes. Plântulas de arroz submetidas à salinidade (NaCl a 200 mM) apresentaram teores reduzidos de amido em suas folhas, em consequência da inibição da atividade da SS e da expressão de seus genes nessas condições (CHEN; CHEN; WANG, 2008). Dessa forma, é possível que a redução na atividade da SS tenha resultado da inibição

da síntese e/ou ativação dessa enzima durante a germinação e o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce.

Como pode ser observado na Figura 17, os maiores valores das atividades total e específica da enzima fosforilase do amido (SP) foram encontrados nos cotilédones das sementes quiescentes (ED 0). Além disso, observou-se que a atividade da SP seguiu duas tendências: a primeira, de redução, compreendida entre o ED 0 e o ED 4, e a segunda, de aumento, ocorrida entre o ED 4 e o ED 8 (Figura 17). Os efeitos da salinidade sobre a atividade da SP só foram significativos no ED 8, em cujas plântulas tanto a atividade total quanto a específica foram reduzidas, em relação ao controle (Figura 17).

A enzima fosforilase do amido (SP) esteve ativa durante a germinação e a fase inicial do estabelecimento (entre o ED 0 e o ED 4), em concomitância com o acúmulo transiente de amido nos cotilédones (Figuras 8, 16 e 17). Dessa forma, é pouco provável que ela tenha atuado na degradação do amido. A reação catalisada pela SP é reversível; ela pode tanto remover unidades de glicose, através da clivagem fosforolítica do amido, produzindo glicose-1-fosfato, quanto adicioná-las ao amido preexistente, utilizando a glicose-1-fosfato como substrato e liberando P_i . A predominância da reação em um sentido, em detrimento do outro, depende da natureza do órgão ou tecido em questão e mais precisamente, da razão entre as concentrações de glicose-1-fosfato e P_i (TETLOW; MORELL; EMES, 2004). A reação de fosforólise do amido é a que prevalece em tecidos fonte, tais como as folhas, durante a noite (SMITH *et al.*, 2003). Por outro lado, em tecidos dreno, tais como sementes e frutos em desenvolvimento, a enzima SP parece atuar no sentido da síntese do amido (MOTA *et al.*, 2002). Ohdan *et al.* (2005) observaram que em grãos de arroz, os níveis dos transcritos do principal gene que codifica para a enzima SP aumentaram cerca de 10 vezes durante os cinco primeiros dias do desenvolvimento do endosperma. Resultado semelhante foi observado por Schupp e Ziegler (2004), durante a maturação do grão de trigo. Além disso, eles observaram

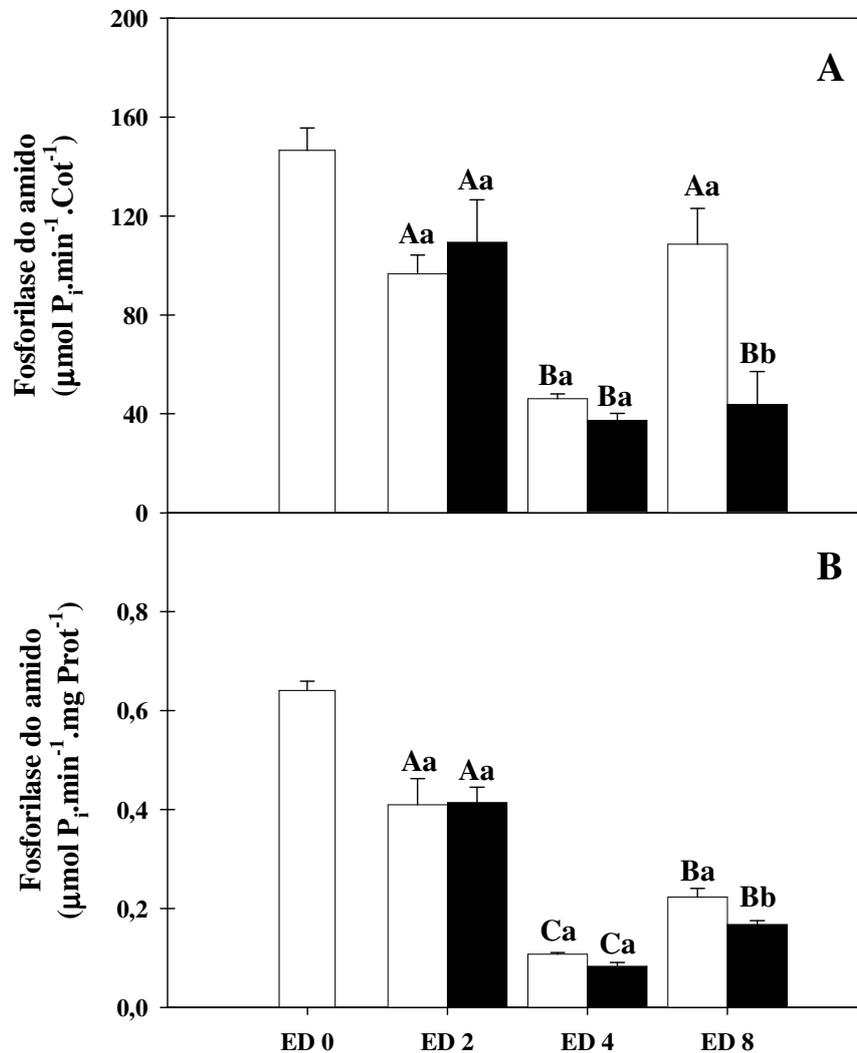


Figura 17. Atividade total (A) e específica (B) da fosforilase do amido proveniente de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (□)] e salino [solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 (■) dS.m⁻¹]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

que a atividade da SP manteve-se elevada por vários dias após o início do desenvolvimento do grão.

A enzima fosforilase do amido (SP) esteve ativa durante a germinação e a fase inicial do estabelecimento (entre o ED 0 e o ED 4), em concomitância com o acúmulo transiente de amido nos cotilédones (Figuras 8, 16 e 17). Dessa forma, é pouco provável que ela tenha atuado na degradação do amido. A reação catalisada pela SP é reversível; ela pode tanto remover unidades de glicose, através da clivagem fosforolítica do amido, produzindo glicose-1-fosfato, quanto adicioná-las ao amido preexistente, utilizando a glicose-1-fosfato como substrato e liberando P_i . A predominância da reação em um sentido, em detrimento do outro, depende da natureza do órgão ou tecido em questão e mais precisamente, da razão entre as concentrações de glicose-1-fosfato e P_i (TETLOW; MORELL; EMES, 2004). A reação de fosforólise do amido é a que prevalece em tecidos fonte, tais como as folhas, durante a noite (SMITH *et al.*, 2003). Por outro lado, em tecidos dreno, tais como sementes e frutos em desenvolvimento, a enzima SP parece atuar no sentido da síntese do amido (MOTA *et al.*, 2002). Ohdan *et al.* (2005) observaram que em grãos de arroz, os níveis dos transcritos do principal gene que codifica para a enzima SP aumentaram cerca de 10 vezes durante os cinco primeiros dias do desenvolvimento do endosperma. Resultado semelhante foi observado por Schupp e Ziegler (2004), durante a maturação do grão de trigo. Além disso, eles observaram que a atividade da SP manteve-se elevada por vários dias após o início do desenvolvimento do grão.

Entre o ED 0 e o ED 4, os cotilédones das plântulas de cajueiro anão-precoce apresentaram-se como órgãos dreno, haja vista que houve a síntese de grandes quantidades de amido no seu interior. Com base nisso e nos resultados aqui apresentados, bem como nas evidências mostradas por outros autores, parece plausível que a SP tenha contribuído para o início da síntese do amido. No entanto, a atividade da SP declinou nesse ínterim, dando lugar

à reação catalisada pela enzima SS, cuja atividade aumentou entre os ED 0 e 4, tornando-se, provavelmente, a principal contribuinte para o acúmulo de amido. O aumento ocorrido na atividade da SP entre o ED 4 e o ED 8, resultante, possivelmente, da expressão aumentada dos genes dessa enzima, teve como provável finalidade degradar o amido; nesse ínterim, os cotilédones já atuavam como órgãos fonte. Todavia, a atividade da SP no ED 8 foi inibida pela salinidade, em consequência da provável inibição da expressão do gene e/ou da síntese dessa enzima nessas condições.

A atividade amilolítica nos cotilédones de plântulas de cajueiro anão-precoce encontra-se representada na Figura 16. Não foi encontrada atividade amilásica na semente quiescente (ED 0). Já no ED 2 e ED 4, a atividade amilásica apresentou valores igualmente baixos, mas aumentou consideravelmente nos cotilédones das plântulas no ED 8, que foi o único ED em que a atividade foi afetada pela salinidade, observando-se redução na atividade amilásica total e específica nesses órgãos (Figura 18).

A ausência de atividade amilásica no ED 0 dá indícios de que em cajueiro anão-precoce, esta enzima foi sintetizada *de novo* e/ou ativada, somente após a embebição. Resultados similares foram encontrados em cotilédones de plântulas de lentilha (TÁRRAGO; NICOLÁS, 1976), feijoeiro comum (MORI *et al.*, 1982) e feijão-de-corda (PRISCO, ENÉAS-FILHO; GOMES-FILHO, 1981; OLIVEIRA NETO *et al.*, 1998). Os níveis baixos de atividade amilásica no ED 2 e ED 4 coincidiram com a fase de acúmulo transiente do amido nos cotilédones e com o aumento gradual da atividade da SS (Figuras 16 e 17). Isso parece admissível, na tentativa de se evitar um ciclo fútil. Contudo, na etapa final do estabelecimento da plântula (ED 8), a atividade amilásica aumentou drasticamente em relação aos demais ED, em paralelo à intensa redução nos teores de amido acumulados anteriormente.

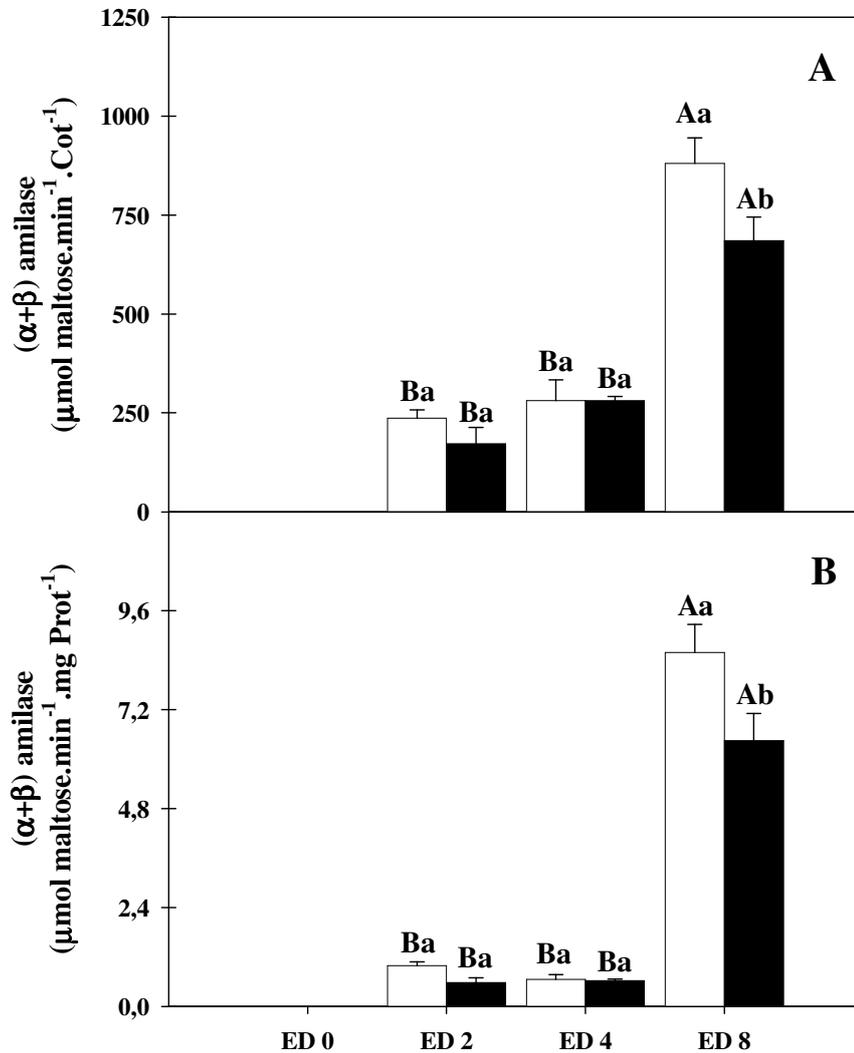


Figura 18. Atividade total (A) e específica (B) das $(\alpha+\beta)$ -amilases provenientes de cotilédones de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce em diferentes estádios de desenvolvimento (ED) e submetidas aos tratamentos controle [água destilada (\square)] e salino [solução de NaCl com condutividade elétrica de 18,0 (\blacksquare) $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$]. As barras em cada coluna representam o erro padrão. Letras minúsculas iguais em um mesmo ED ou maiúsculas iguais em um mesmo nível de salinidade não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Os asteriscos indicam que não há diferença estatística entre o ED 0 e qualquer tratamento em um determinado ED ($p \leq 0,05$).

Como já mencionado, apenas nas plântulas no ED 8 é que a atividade amilásica foi afetada pela salinidade, feito este que pode ter contribuído para os menores teores de carboidratos redutores observados nos cotilédones dessas plântulas, especialmente no mais alto nível de salinidade (Figura 10). A inibição da mobilização de reservas amiláceas durante a germinação de feijão-de-corda em condições de salinidade (NaCl a 100 mM) foi atribuída a uma redução nas atividades das α e β -amilases (PRISCO; ENÉAS-FILHO; GOMES-FILHO, 1981). Posteriormente, foi comprovado que esta inibição apresentada pela α -amilase era devida a uma redução na sua expressão (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1998). Pode-se sugerir que tenha acontecido o mesmo nos cotilédones de cajueiro anão-precoce, embora não se possa garantir que os efeitos inibitórios dos sais tenham atuado indistintamente sobre a α -amilase e a β -amilase.

4. CONCLUSÕES

A etapa compreendida entre o ED 4 e o ED 8 foi a de maior depleção na massa seca dos cotilédones e deveu-se à mobilização das reservas cotiledonares, cujos produtos foram utilizados para suprir o intenso crescimento do eixo embrionário nesse ínterim.

Os lipídios representaram a maior fração das substâncias de reserva dos cotilédones e foram intensamente mobilizados desde a emergência da radícula (ED 2), o que foi acompanhado por um aumento gradativo na atividade das enzimas lipase, liase do isocitrato e sintase do malato. A inibição da mobilização lipídica ocasionada pela salinidade parece ter sido mediada pela inibição da atividade lipásica e/ou de etapas posteriores ao ciclo do glicoxalato.

A mobilização de proteínas ocorreu simultaneamente à dos lipídios e resultou no aumento dos teores de aminoácidos livres nos cotilédones. A inibição da mobilização protéica, em razão da salinidade, pode ter sido resultado do provável *feedback* atuante sobre a atividade proteásica, visto que houve o acúmulo de aminoácidos nos cotilédones (inibição de seu transporte para o eixo embrionário), principalmente nas plântulas crescidas a 12,0 e 18,0 dS.m⁻¹.

Houve o acúmulo transiente de amido nos cotilédones durante o estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce e isso pareceu garantir que a mobilização das reservas cotiledonares prosseguisse adequadamente. A etapa de acúmulo do amido ocorreu entre o ED 0 e o ED 4, mediada, possivelmente, pela ação conjunta das enzimas sintase do amido e fosforilase do amido, enquanto a etapa de degradação do amido, ocorrida entre o ED 4 e o ED 8, foi mediada pela enzimas ($\alpha+\beta$)-amilase e fosforilase do amido. O menor acúmulo do amido nos cotilédones das plântulas crescidas a 18,0 dS.m⁻¹ resultou da inibição da atividade da enzima sintase do amido. A etapa de degradação, por sua vez, também foi afetada,

resultando na redução dos teores de carboidratos redutores nos cotilédones, como consequência da inibição da atividade das enzimas (α + β)-amilase e fosforilase do amido.

Os teores de carboidratos solúveis nos cotilédones foram ditados pela sua utilização (fração não-redutora) na etapa de germinação (entre o ED 0 a ED 2), pela sua produção a partir da mobilização lipídica (fração não-redutora) e amilácea (fração redutora) e pelo seu transporte para o eixo embrionário (fração não-redutora). Entretanto, a salinidade afetou esses processos, resultando em teores reduzidos de carboidratos redutores nas plântulas no ED 8 e inibindo o transporte dos carboidratos não-redutores para o eixo embrionário.

A salinidade alterou o dreno exercido pelo eixo embrionário sobre os produtos da mobilização das reservas (aminoácidos e sacarose), causando a inibição de seu transporte para o eixo embrionário e seu acúmulo nos cotilédones. Conseqüentemente, houve a redução nos teores de aminoácidos livres e de carboidratos solúveis do eixo embrionário.

Os efeitos inibitórios da salinidade sobre a mobilização das reservas cotiledonares e sobre o metabolismo do eixo embrionário em crescimento pareceram resultar de seu componente iônico, tendo em vista que houve um acúmulo excessivo de íons tóxicos (Na^+ e Cl^-) em ambas as partes das plântulas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C.E.B.; PRISCO, J.T.; NOGUEIRA, A.R.C.; BEZERRA, M.A.; LACERDA, C.F.; GOMES-FILHO, E. Physiological and biochemical changes occurring in dwarf-cashew seedlings subjected to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, p. 105-118, 2008.

ADAMS, C.A.; RINNE, R.W.; FJERSTAD, M.C. Starch deposition and carbohydrase activities in developing and germinating soya bean seeds. **Annals of Botany**, v. 45, p. 577-582, 1980.

ALLFREY, J.M.; NORTHCOTE, D.H. The effects of the axis and plant hormones on the mobilization of storage materials in the ground-nut (*Arachis hypogaea*) during germination. **New Phytologist**, v. 78, p. 547-563, 1977.

ALVES, F.A.L.; FERREIRA-SILVA, S.L.; SILVA, E.N.; SILVEIRA, J.A.G. Clones de cajueiro anão-precoce expostos ao estresse salino e ao acúmulo de potássio e sódio. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, p. 422-428, 2008.

ASHRAF, M.; ZAFAR, R.; ASHRAF, M.Y. Time-course changes in the inorganic and organic components of germinating sunflower achenes under salt (NaCl) stress. **Flora**, v. 198, p. 26-36, 2003.

ASHRAF, M.Y.; AFAF, R.; QURESHI, M.S.; SARWAR, G.; NAQVI, M.H. Salinity induced changes in α -amylase and protease activities and associated metabolism in cotton varieties during germination and early seedling growth stages. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 24, p. 37-44, 2002.

ASHTON, F.M. Mobilization of storage proteins of seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 27, p. 95-117, 1976.

AZEVEDO NETO, A.D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T. Salinity and oxidative stress. In: KHAN, N.A.; SINGH, S. (Org.). **Abiotic Stress and Plant Responses**. Aligarh: IK International Group, 2008. p. 58-82.

BAETHGEN, W.E.; ALLEY, M.M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, p. 961-969, 1989.

BARROS, L.M. Botânica, origem e distribuição geográfica. In: ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. (Org.). **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 1995. p. 55-72.

BEEVERS, H. The role of the glyoxylate cycle. In: STUMPF, P.K. **The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise**. v. 4. Orlando: Academic Press, 1980. p. 117-130.

BEN-MILED, D.D.; ZARROUK, M.; CHÉRIF, A. Sodium chloride effects on lipase activity in germinating rape seeds. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 899-902, 2000.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BEWLEY, J.D.; LEUNG, D.W.M.; MacISAAC, S.; REID, J.S.G.; XU, N. Transient starch accumulation in the cotyledons of fenugreek seeds during galactomannan mobilization from the endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 31, p. 483-490, 1993.

BEZERRA, I.L.; GHEYI, H.R.; FERNANDES, P.D.; SANTOS, F.J. de S.; GURGEL, M.T.; NOBRE, R.G. Germinação, formação de porta-enxertos e enxertia de cajueiro anão-precoce sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, p. 420-424, 2002.

BEZERRA, M.A.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Crescimento e fotossíntese de plantas jovens de cajueiro anão precoce sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 9 (suplemento), p. 90-94, 2005.

BINNS, D.; JANUSZEWSKI, T.; CHEN, Y.; HILL, J.; MARKIN, V.S.; ZHAO, Y.; GILPIN, C.; CHAPMAN, K.D.; ANDERSON, R.G.W.; GOODMAN, J.M. An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. **Journal of Cell Biology**, v. 173, p. 719-731, 2006.

BLISS, R.D.; PLATT-ALOIA, K.A.; THOMSON, W.W. The inhibitory effect of NaCl on barley germination. **Plant, Cell and Environment**, v. 9, p. 727-733, 1986.

BOGATEK, R.; ZARSKA-MACIEJEWSKA, B.; SIŃSKA, I.; LEWAK, S. The embryonic axis controls lipid catabolism in cotyledons of apple seeds during germination. **Physiologia Plantarum**, v. 76, p. 557-562, 1989.

BOREK, S.; RATAJCZAK, W. Sugars as a metabolic regulator of storage protein mobilization in germinating seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 24, p. 425-434, 2002.

BORGES, I.F.; BARBEDO, C.J.; RITCHER, A.A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C. Variations in sugar and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 475-482, 2006.

BOTELLA, M.A.; ROSADO, A.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Plant adaptative responses to salinity stress. In: JENKS, M.A.; HASEGAWA, P.M. **Plant Abiotic Stress**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2005. p. 37-70.

BRADFORD, K.J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Eds.). **Seed Development and Germination**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p.351-396.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254. 1976.

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

BROWN, C.S.; HUBER, S.C. Reserve mobilization and starch formation in soybean (*Glycine max*) cotyledons in relation to seedling growth. **Physiologia Plantarum**, v. 72, p. 518-524, 1988.

BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004a. p. 31-50.

BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004b. p. 163-188.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 141-156, 2000.

CACHO, M.; GUERRA, H.; FERNÁNDEZ-TÁRRAGO, J.; ALVAREZ, J. Effect of the embryonic axis and seed coat on protein degradation in *Lens culinaris* cotyledons. **Environmental and Experimental Botany**, v. 38, p. 263-269, 1997.

CARNEIRO, P.T.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; SOARES, F.A.L. Germinação e crescimento inicial de genótipos de cajueiro anão-precoce em condições de salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, p. 199-206, 2002.

CARNEIRO, P.T.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; SOARES, F.A.L.; VIANA, S.B.A. Tolerância de porta-enxertos de cajueiro anão-precoce à salinidade – índices fisiológicos e de crescimento. **Scientia Agrícola**, v. 61, p. 9-16, 2004.

CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J. HILHORST, H.W.M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 51-67.

CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.

CAVALCANTI JUNIOR, A.T. **Morfo-fisiologia da germinação e estabelecimento da plântula do cajueiro anão-precoce**. 1994. 84 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.

CHAPMAN, J.M.; GALLESCHI, L. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. VI. The production of starch. **Annals of Botany**, v. 55, p. 29-34, 1985.

CHARTZOULAKIS, K.S.; KLAPAKI, G. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. **Scientia Horticulture**, v. 86, p. 247-260, 2000.

CHEN, H.-J.; CHEN, J.-Y.; WANG, S.-J. Molecular regulation of starch accumulation in rice seedling leaves in response to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 135-142, 2008.

CHENEVARD, D.; FROSSARD, J.S.; LACOINTE, A. Lipid utilization and carbohydrate partitioning during germination of English walnut (*Juglans regia*). **Annals of Forest Science**, v. 51, p. 373-379, 1994.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J-K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v. 45, p. 437-448, 2005.

COCUCCI, A.E.; MARIATH, J.E.A. Gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 15-30.

CORCHETE, P.; GUERRA, H. Effect of NaCl and polyethylene glycol on solute content and glycosidase activities during germination of lentil seeds. **Plant, Cell and Environment**, v. 9, p. 589-593, 1986.

CORDEIRO, G.G. **Salinidade em agricultura irrigada: conceitos básicos e práticos**. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido, 2001. 38p. (EMBRAPA, Documentos, n.º 180.).

CORNAH, J.E.; GERMAIN, V.; WARD, J.L.; BEALE, M.H.; SMITH, S.M. Lipid utilization, gluconeogenesis, and seedling growth in *Arabidopsis* mutants lacking the glyoxylate cycle enzyme malate synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 42916-42923, 2004.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. 2. ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988. 555p.

DAKER, A. **A água na agricultura: irrigação e drenagem**. 7. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1988. 543p.

DAVIES, H.V.; CHAPMAN, J.M. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. I. The influence of embryonic axis and testa on protein and lipid degradation. **Planta**, v. 146, 579-584, 1979a.

DAVIES, H.V.; CHAPMAN, J.M. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. II. The role of the embryonic axis. **Planta**, v. 146, 585-590, 1979b.

DAVIES, H.V.; CHAPMAN, J.M. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. III. The control of protein degradation. **Planta**, v. 149, 288-291, 1980.

DAVIES, H.V.; SLACK, P.T. The control of food mobilization in seeds of dicotyledonous plants. **New Phytologist**, v. 88, p. 41-51, 1981.

DIXON, G.H.; KORNBERG, H.L. Assay methods for key enzymes of the glyoxalate cycle. **Biochemistry Journal**, v. 72, 3P, 1959.

DOMAN, D.C.; WALKER, J.C.; TRELEASE, R.N.; MOORE, B. Metabolism of carbohydrate and lipid reserves in germinated cotton seeds. **Planta**, v. 155, p. 502-510, 1982.

DOWNIE, B.; BEWLEY, J.D. Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination. **Physiologia Plantarum**, v. 110, p. 1-12, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUMAS, C.; ROGOWSKY, P. Fertilization and early seed formation. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 715-725, 2008.

EASTMOND, P.J. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 45540-45545, 2004a.

EASTMOND, P.J. Glycerol-insensitive *Arabidopsis* mutants: *gli1* seedlings lack glycerol kinase, accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress. **The Plant Journal**, v. 37, p. 617-625, 2004b.

EASTMOND, P.J. *SUGAR-DEPENDENT1* encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. **The Plant Cell**, v. 18, p. 665-675, 2006.

EASTMOND, P.J.; GERMAIN, V.; LANGE, P.R.; BRYCE, J.H.; SMITH, S.M.; GRAHAM, I.A. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle.

Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, p. 5669-5674, 2000.

EASTMOND, P.J.; GRAHAM, I.A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 72-77, 2001.

ESECHIE, H.A.; AL-SAIDI, A.; AL-KHANJI, S. Effect of sodium chloride salinity on seedling emergence in chickpea. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 188, p. 155-160, 2002.

FAGERIA, N.K.; GHEYI, H.R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. In: GHEYI, H.R.; QUEIROZ, J.E.; MEDEIROS, J.M. (eds.). **Manejo e controle da salinidade na agricultura**. Campina Grande: UFPB/SBEA, 1997. p. 363-383.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils**. 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2006.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistical databases – Production – Crops Primary**. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>>. Acesso em: 03 fev. 2009.

FENNER, M.; THOMPSON, K. **The Ecology of Seeds**. New York: Cambridge University Press, 2005. 250p.

FERREIRA-SILVA, S.L.; SILVEIRA, J.A.G.; VOIGT, E.L.; SOARES, L.S.P.; VIÉGAS, R.A. Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, p. 51-59, 2008.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, H. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FREVERT, J.; KINDL, H. Purification of glyoxysomal acetyl-CoA acyltransferase. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, v. 361, p. 537-542, 1980.

GAINES, T.P.; PARKER, M.B.; GASCHO, G.J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate extraction. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 371-374, 1984.

GERMAIN, V.; RYLOTT, E.L.; LARSON, T.R.; SHERSON, S.M.; CARDE, J.-P.; BRYCE, J.H.; GRAHAM, I.A.; SMITH, S.M. Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid β -oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings. **The Plant Journal**, v. 28, p. 1-12, 2001.

GILFFORD, D.J.; THAKORE, E.; BEWLEY, J.D. Control by the embryo axis of the breakdown of storage proteins in the endosperm of germinated castor bean seed: a role for gibberellic acid. **Journal of Experimental Botany**, v. 35, p. 669-677, 1984.

GLEVAREC, G.; BOUTON, S.; JASPARD, E.; RIOU, M.-T.; CLIQUET, J.-B.; SUZUKI, A.; LIMAMI, A.M. Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. **Planta**, v. 219, p. 286-287, 2004.

GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T. Effects of salinity in vivo and in vitro on the proteolytic activity of *Vigna sinensis* (L.) Savi cotyledons during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 1, p. 83-88, 1978.

GOMES-FILHO, E.; SODEK, L. Effect of salinity on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. **Journal of Plant Physiology**, v. 132, p. 307-311, 1988.

GOMES-FILHO, E.; LIMA, C.R.F.M.; COSTA, J.H.; SILVA, A.C.M.; LIMA, M.G.S.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T. Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 147-157, 2008.

GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T.; CAMPOS, F.A.P.; ENÉAS-FILHO, J. Effects of salinity in vivo and in vitro on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p. 183-188, 1983.

GRAHAM, I.A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 115-142, 2008.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.

GUGLIELMINETTI, L.; YAMAGUCHI, J.; PERATA, P.; ALPI, A. Amylolytic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic conditions. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1069-1076, 1995.

GUPTA, A.; BHATLA, S.C. Spatial and temporal changes in lipase activity sites during oil body mobilization in protoplasts from sunflower seedling cotyledons. **Plant Growth Regulation**, v. 46, p. 11-17, 2005.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98-99, 2002.

HANLEY, M.E.; FENNER, M.; WHIBLEY, H.; DARVILL, B. Early plant growth: identifying the end point of the seedling phase. **New Phytologist**, v. 163, p. 61-66,

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

HAYASHI, M.; BELLIS, L.; ALPI, A.; NISHIMURA, M. Cytosolic aconitase participates in the glyoxylate cycle in etiolated pumpkin cotyledons. **Plant and Cell Physiology**, v. 36, p. 669-680, 1995.

HAYASHI, Y.; HAYASHI, M.; HAYASHI, H.; HARA-NISHIMURA, I.; NISHIMURA, M. Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of the *Arabidopsis thaliana ped1* mutant. **Protoplasma**, v. 218, p. 83-94, 2001.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **The Plant Cell**, v. 11, p. 610-613, 1999.

HERRERA-RODRIGUEZ, M.B.; MALDONADO, J.M.; PÉREZ-VICENTE, R. Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1061-1070, 2006.

HOCK, B.; BEEVERS, H. Development and decline of the glyoxylate-cycle enzymes in watermelon seedlings (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Effects of dactinomycin and cycloheximide. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v. 55, p. 405-414, 1966.

HODGE, J.E.; HOFREITER, B.R. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WILSTER, R.L.; WOLFROM, M.L. (Ed.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, 1962. v.1, p.380-394.

HOPPE, A.; THEIMER, R.R. Enzymes for lipolysis and fatty acid metabolism in different organelle fractions from rape seed cotyledons. **Planta**, v. 202, p. 227-234, 1997.

HOSSEINI, M.K.; POWELL, A.A.; BINGHAM, I.J. Comparison of the seed germination and early seedling growth of soybean in saline conditions. **Seed Science Research**, v. 12, p. 165-172, 2002.

HUANG, A.H.C. Lipases. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (Eds.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. v. 9. Orlando: Academic Press, 1987. p. 91-120.

HUANG, A.H.C. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 177-200, 1992.

HUANG, A.H.C.; MOREAU, R.A. Lipases in the storage tissues of peanut and other oil seeds during germination. **Planta**, v. 141, p. 111-116, 1978.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 20, n. 12, 2008. 80p.

ISOLA, M.C.; FRANZOINI, L. Changes of aspartate aminotransferase activity, its isoform pattern, and free amino acids content in peanut cotyledons during seed germination. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 22, p. 125-128, 2000.

KAUR, S.; GUPTA, A.K.; KAUR, N. Gibberellin A₃ reverses the effect of salt stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings amylase activity and mobilization of starch in cotyledons. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 85-90, 1998.

KAUR, S.; GUPTA, A.K.; KAUR, N. Indole acetic acid mimics the effect of salt stress in relation to enzymes of carbohydrate metabolism in chickpea seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 91-98, 2003.

KARUNAGARAN, D.; RAO, R. Mode and control of starch mobilization during germination of seeds of horse gram. **Plant Science**, v. 73, p. 155-159, 1991.

KAYANI, S.A.; NAQVI, H.H.; TING, I.P. Salinity effects on germination and mobilization of reserves in jojoba seed. **Crop Science**, v. 30, p. 704-708, 1990.

KITAJIMA, K. Cotyledon functional morphology, patterns of seed reserve utilization and regeneration niches of tropical tree seedlings. In: SWAINE, M.D. (Ed.). **The Ecology of Tropical Forest Tree Seedlings**. Carnforth: Parthenon, 1996. p. 193-210.

LEE, Y.P. Potato phosphorylase. In: NEUFELD, E.F.; GINSBURG, V. (Ed.) **Methods in Enzymology**. Complex Carbohydrates, v. 8, p. 550-554, 1966.

LEHMANN, T.; RATAJCZAK, L. The pivotal role of glutamate dehydrogenase (GDH) in the mobilization of N and C from storage material to asparagine in germinating seeds of yellow lupine. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 149-158, 2008.

LEHMANN, T.; RATAJCZAK, L.; DECKERT, J.; PRZYBYLSKA, M. The modifying effect of sucrose on glutamate dehydrogenase (GDH) activity in lupine embryos treated with inhibitors of RNA and protein synthesis. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 25, p. 325-335, 2003.

LIMA, V.P.M.S. Origem e distribuição geográfica. In: LIMA, V. de P.M.S. (Org.). **Cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB, Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste, 1988. p. 1-14.

LIMA, V.P.M.S. Botânica. In: LIMA, V. de P.M.S. (Org.). **Cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB, Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste, 1988. p. 15-61.

LONGO, G.P.; PEDRETTI, M.; ROSSI, G.; LONGO, C.P. Effect of benzyladenine on the development of plastids and microbodies in excised watermelon cotyledons. **Planta**, v. 145, p. 209-217, 1979.

LOS REYES, B.G.; MYERS, S.J.; McGRATH, J.M. Differential induction of glyoxylate cycle enzymes by stress as a marker for seedling vigor in sugar beet (*Beta vulgaris*). **Molecular Genetics and Genomics**, v. 269, p. 692-698, 2003.

MAIA, G.A.; HOLANDA, L.F.F.; MARTINS, C.B. Características químicas e físicas da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 1, p. 39-46, 1971.

MAIA, G.A.; STULL, J.W. Composição de ácidos graxos dos lipídios do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 7, p.49-52, 1977.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1989. 201p.

MANSOUR, M.M.F.; SALAMA, K.H.A. Cellular basis of salinity tolerance in plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 113-122, 2004.

MARQUES, E.C. **Efeitos da salinidade na germinação e estabelecimento de plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) ano-precoce**. 2007. 66 f. (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MELO, F.P.L.; AGUIAR NETO, A.V.; SIMABUKURO, E.A.; TABARELLI, M. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 237-250.

MILED-DAOUD, D.B.; CHÉRIF, A. Effet du NaCl sur l'utilisation des lipids et les activités enzymatiques glyoxysomales au cours de la germination de deux espèces de *Medicago*. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 876-883, 1991.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MONERRI, C.; GARCIA-LUIS, A.; GUARDIOLA, J.L. Sugar and starch changes in pea cotyledons during germination. **Physiologia Plantarum**, v. 67, p. 49-54, 1986.

- MOREAU, R.A.; HUANG, A.H.C. Gluconeogenesis from storage wax in the cotyledons of jojoba seedlings. **Plant Physiology**, v. 60, p. 329-333, 1977.
- MORI, H.; TATEMATSU, A.; MATSUI, H.; TAKAYANAGI, T.; HONMA, M; CHIBA, S. Starch-hydrolysing enzymes in germinating kidney beans. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 1499-1500, 1982.
- MOTA, R.V.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; PURGATTO, E.; ROSSETO, M.R.M.; LAJOLO, F.M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. **Planta**, v. 216, p. 325-333, 2002.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.
- MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole-plant responses to salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 143-160, 1986.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.
- MUÑOZ, J.L; MARTIN, L.; NICOLAS, G.; VILLALOBOS, N. Influence of endogenous cytokinins on reverse mobilization in cotyledons of *Cicer arietinum* L. Reproduction of endogenous levels of total cytokinins, zeatin, zeatin riboside, and their corresponding glucosides. **Plant Physiology**, v. 93, p. 1011-1016, 1990.
- MÜNTZ, K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 605-622, 1996.
- MÜNTZ, K. Deposition of storage proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 38, p.77-99, 1998.
- MÜNTZ, K; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1741-1752, 2001.
- NAGARAJA, K.V. Lipids of high-yielding varieties of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 37, p. 307-311, 1987.

NANDI, S.K.; PALNI, L.M.S; KLERK, G.J.M. The influence of the embryonic axis and cytokinins on reserve mobilization in germinating lupin seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 329-336, 1995.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger**: Princípios de Bioquímica. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1232p.

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

NONOGAKI, H.; CHEN, F.; BRADFORD, K.J. Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. In: BRADFORD, K.J.; NONOGAKI, H. **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2007. p. 264-304.

OHDAN, T.; FRANCISCO JUNIOR, P.B.; SAWADA, T.; HIROSE, T.; TERAU, T.; SATOH, H.; NAKAMURA, Y. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 3229-3244, 2005.

OHTO, M.; STONE, S.L.; HARADA, J.J. Genetic control of seed development and seed mass. In: BRADFORD, K.J.; NONOGAKI, H. (Ed.). **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2007. p. 1-24.

OLIVEIRA, F.N.S. (Ed.). **Sistema de produção para manejo do cajueiro comum e recuperação de pomares improdutivos**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 2004. 36p. (EMBRAPA, Sistemas de Produção, n.º 2).

OLIVEIRA, V.H. (Ed.). **Cultivo do cajueiro anão precoce**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 2002. 40p. (EMBRAPA, Sistemas de Produção, n.º 1).

OLIVEIRA, V.H. Cajucultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452008000100001&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 07 fev. 2009.

OLIVEIRA-NETO, O.B.; DAMASCENO, A.T.; CAMPOS, F.A.P.; GOMES-FILHO, E.; ENÉAS-FILHO, J.; PRISCO, J.T. Effect of NaCl-salinity on the expression of a cotyledonary α -amylase from *Vigna unguiculata*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 97-100, 1998.

OLSEN, L.J.; HARADA, J.J. Peroxisomes and their assembly in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 123-146, 1995.

OSBOURNE, T.B. **The Vegetable Protein**. 2. ed. London: Longmans, Green and Co., 1924. 134p.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

PAULA PESSOA, P.F.A.; LEITE, L.A.S.; PIMENTEL, C.R.M. Situação atual e perspectivas da agroindústria do caju. In: ARAÚJO, J.P.P. de; SILVA, V.V. de (Org.). **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 1995. p. 23-42.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, v. 11, p. 185-197, 2001.

PONTE, L.F.A **Controle fonte-dreno da mobilização de reservas na germinação e estabelecimento de plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) expostas à salinidade**. 2007. 125 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

PRACHAROENWATTANA, I; CORNAH, J.E.; SMITH, M.M. Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in β -oxidation but not in the glyoxylate cycle. **The Plant Journal**, v. 50, p. 381-390, 2007.

PRACHAROENWATTANA, I; SMITH, S.M. When is a peroxisome not a peroxisome? **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 522-525, 2008.

PRISCO, J.T. Alguns aspectos da fisiologia do “stress” salino. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, p. 85-94, 1980.

PRISCO, J.T. **Contribuição ao estudo da fisiologia do estresse salino durante a germinação e estabelecimento da plântula de uma glicófita [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. 1987. 65 f. Tese (Professor Titular de Fisiologia Vegetal) — Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1987.

PRISCO, J.T.; ENÉAS FILHO, J.; GOMES FILHO, E. Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 63-71, 1981.

PRISCO, J.T.; O'LEARY, J.W. Osmotic and "toxic" effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Turrialba**, v. 20, p. 177-184, 1970.

PRISCO, J.T.; VIEIRA, G.H.F. Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 317-320, 1976.

PRITCHARD, S.L.; CHARLTON, W.L.; BAKER, A.; GRAHAM, I.A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 31, p. 639-647, 2002.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RICHARDS, L.A. (Ed.). **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington: US Department of Agriculture, Handbook n.º 60, 1954. 160p.

RITCHIE, S.; SWANSON, S.J.; GILROY, S. Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. **Seed Science Research**, v. 10, p. 193-212, 2000.

ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. Water and seed survival. **Annals of Botany**, v. 63, p. 39-52, 1989.

RYLOTT, E.L.; GILDAY, A.D.; GRAHAM, I.A. The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Arabidopsis* is essential for seedling establishment. **Plant Physiology**, v. 131, p. 1834-1842, 2003.

RYLOTT, E.L.; HOOKS, M.A.; GRAHAM, I.A. Co-ordinate regulation of genes involved in storage lipid mobilization in *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, p. 283-287, 2001.

SADEGHIPOUR, H.R.; BAHTLA, S.C. Differential sensitivity of oleosins to proteolysis during oil body mobilization in sunflower seedlings. **Plant Cell and Physiology**, v. 43, p. 1117-1126, 2002.

SAEED, M.; DUCK, S.H. Amylases in pea tissues with reduced density and/or function, **Plant Physiology**, v. 94, p. 1813-1819, 1990.

SCHUPP, N.; ZIEGLER, P. The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 1471-1484, 2004.

SHANNON, M.C.; GRIEVE, C.M. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 5-38, 1999.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.

SILOTO, R.M.P.; FINDLAY, K.; LOPEZ-VILLALOBOS, A.; YEUNG, E.C.; NYKIFORUK, C.L.; MOLONEY, M.M. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 18, p. 1961-1974, 2006.

SILVA, R.N.; DUARTE, G.L.; LOPES, N.F.; MORAES, D.M.; PEREIRA, A.L.A. Composição química de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas a estresse salino na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p. 215-220, 2008.

SMITH, A.M.; DENYER, K.; MARTIN, C. The synthesis of the starch granule. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 67-87, 1997.

SMITH, A.M.; ZEEMAN, S.C.; THORNEYCROFT, D.; SMITH, S.M. Starch mobilization in leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 577-583, 2003.

SOLTANI, A.; GHOLIPOOR, M.; ZEINALI, E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, p. 195-200, 2006.

SOUZA-FILHO, M.S.M.; MAIA, G.A.; ORIÁ, H.F.; OLIVEIRA, G.S.F.; FIGUEIREDO, R.W. Características químicas da amêndoa da castanha de diferentes clones do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 20, p. 101-104, 1989.

SRIVASTAVA, L.M. **Plant growth and development: hormones and environment.** California: Academic Press, 2001. 772p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TANEYAMA, M.; OKAMOTO, T.; YAMANE, H.; MINAMIKAWA, T. Effect of benzyladenine on the development of plastids and microbodies in excised watermelon cotyledons. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, p. 1290-1293, 2001.

TÁRRAGO, J.F.; NICOLÁS, G. Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. **Plant Physiology**, v. 58, p. 618-621, 1976.

TETLOW, I.A.; MORELL, M.K.; EMES, M.J. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2131-2145, 2004.

TSAI, Y.-C.; HONG, C.-Y.; LIU, L.-F.; KAO, C.H. Relative importance of Na⁺ and Cl⁻ in NaCl-induced antioxidant systems roots of rice seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p. 86-94, 2004.

TZEN, J.T.C.; HUANG, A.H.C. Surface structure and properties of plant seed oil bodies. **The Journal of Cell Biology**, v. 117, p. 327-335, 1992.

VOIGT, E.L.; ALMEIDA, T.A.; CHAGAS, R.M.; PONTE, L.F.A.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 80-89, 2009.

WAHID, A.; RASUL, E.; RAO, A.-R. Germination of seeds and propagules under salt stress. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of Plant and Crop Stress.** 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p. 153-167.

WALKER, R.P.; CHEN, Z.-H.; TÉCSI, L.I.; FAMIANI, F.; LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. Phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development. **Planta**, v. 210, p. 9-18, 1999.

WANG, T.L.; BOGRACHEVA, T.Y.; HEDLEY, C.L. Starch: as simple as A, B, C? **Journal of Experimental Botany**, v. 49, 481-502, 1998.

WINKLER, U.R.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.

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

YOUNIS, M.E.; HASANEEN, M.N.A.; NEMET-ALLA, M.M. Plant growth, metabolism and adaptation in relation to stress conditions. IV. Effects of salinity on certain factors associated with the germination of three different seeds high in fats. **Annals of Botany**, v. 60, p. 337-344, 1987.

ZHU, J-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 66-71, 2001.

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