

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO ESTRESSE SALINO DE DUAS  
CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI**

**JOÃO BATISTA SANTIAGO FREITAS**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**Dezembro de 2006**

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO ESTRESSE SALINO DE DUAS  
CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI**

**JOÃO BATISTA SANTIAGO FREITAS**

*Tese submetida à Coordenação  
do Curso de Pós-Graduação em  
Bioquímica da Universidade  
Federal do Ceará, como parte  
dos requisitos para a obtenção  
do grau de Doutor em  
Bioquímica.*

**FORTALEZA – CEARÁ**

**Dezembro de 2006**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Azevedo U. Melo CRB-3/572

F936r Freitas, João Batista Santiago

Respostas fisiológicas ao estresse salino de duas cultivares de feijão-caupi  
/ João Batista Santiago Freitas .

135f., il. color., enc.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

Área de Concentração : Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

1. Salinidade 2. Germinação 3. Biomassa 4. Concentração 5. Atividade  
I. Silveira, Joaquim Albenísio Gomes da (orient.) II. Universidade Federal do  
Ceará – Pós-Graduação em Bioquímica III. Título

CDD 574 197

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A transcrição de qualquer trecho dessa Dissertação será permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da Ética Científica.

Tese aprovada em 15 de dezembro de 2006.




João Batista Santiago Freitas

Eng<sup>o</sup> Agrônomo, M.Sc.




Dr. Joaquim Albertino Gomes da Silveira

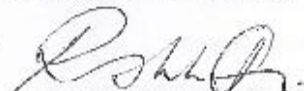
UFC/DBBM – Orientador



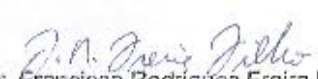
Dr. Benício de Sousa Cavada  
UFC/DBBM – Conselheiro



Dr. Sebastião Medeiros Filho  
UFC/FITOTECNIA – Conselheiro



Dr. Ricardo Almeida Viégas  
UFCEG – Conselheiro



Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho  
EMBRAPA/CNPMPN – Conselheiro

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por todas as bênçãos que tem derramado sobre mim.

À **Natureza** pela nossa ignorância.

Ao Prof. Dr. **Joaquim Albenísio**, pelas cobranças, pelo incentivo; e pela confiança na realização deste trabalho.

Aos professores **Benildo, Tadeu e Thalles**, pela minha qualificação.

Ao professor **Sebastião** Medeiros Filho, pela sua disponibilidade e interesse em participar da avaliação deste trabalho.

Ao pesquisador Francisco Rodrigues **Freire Filho**, pela sua disponibilidade e interesse em contribuir na revisão deste trabalho.

Ao professor **Benildo** de Sousa Cavada, pela sua disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

Ao professor Ricardo Almeida **Viégas**, pela sua disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

Ao professor **Marcos Vinícius** Assunção pelo início de tudo.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que contribuíram para o meu aprendizado durante a minha permanência no curso.

À coordenação do Programa de Pós - Graduação em Bioquímica pelo apoio e atenção durante a realização desta tese.

Aos funcionários, sempre prestativos.

Aos amigos **Josemir, Fábio, Eduardo, Sérgio Luiz**, um agradecimento especial pela ajuda indispensável, na organização de todas as etapas deste trabalho.

Ao amigo **Roberto Barreto**, pela minha introdução no mundo bioquímico.

Aos amigos **Menezes, Nilson, George Leandro (Porcão), Lucilene, Cristine, Valderez, Iza, Luiz Aguiar, Tânia, Roberta, Flávia Carinne, Abel, Jean Carlos,**

**Sandro e Edinilda (Nega)** pela amizade e convivência maravilhosa!

A meus pais **Domingos** in memorium e **Nair**, por me darem vida.

Aos meus **Irmãos** pelo incentivo.

Ao meu filho **André**, pelas ausências.

À minha esposa **Cléa**, pela compreensão.

A todos enfim, que contribuíram para a realização deste trabalho.

*Dedico esta tese à Natureza pela a sua capacidade de ciclar, reciclar e gerar vida.*

*“A luz da natureza não mente,  
Mas os teóricos parecem ter revirado a natureza.  
Se o homem se desvia, quer desviar também a luz da natureza.  
Por isso farás mais do que jamais foi feito sobre a terra.  
Nunca duvides de Deus, nosso melhor médico.  
Amemos a Ele e ao próximo, e Ele nos concederá tudo de que precisarmos.  
Se formos negligentes e esquecermos de amar, aquilo em que acreditamos também  
nos será tirado.”*

*Paracelso*

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
- Universidade Federal do Ceará - UFC
- Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa - FUNCAP



# SUMÁRIO

<b><u>ABREVIATURAS</u></b> .....	<b>xi</b>
<b><u>LISTA DE TABELAS</u></b> .....	<b>xiii</b>
<b><u>LISTA DE FIGURAS</u></b> .....	<b>xiv</b>
<b><u>RESUMO</u></b> .....	<b>xvii</b>
<b><u>ABSTRACT</u></b> .....	<b>xix</b>
<b><u>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO AO ESTUDO DE RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO</u></b> .....	<b>1</b>
1.1. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE .....	2
1.2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1.2.1. A cultura do feijão-caupi [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp] .....	3
1.2.2. Salinidade e seus efeitos nas plantas .....	5
1.2.2.1. Efeitos da salinidade sobre a germinação e estabelecimento de plântulas .....	6
1.2.2.2. Efeito osmótico e deficiência hídrica induzida .....	12
1.2.2.3. Efeitos iônicos e toxicidade .....	13
1.2.2.4. Estresse oxidativo .....	13
1.2.3. Principais respostas adaptativas das plantas ao estresse salino .....	15
1.2.3.1. Compartimentalização de íons tóxicos .....	16
1.2.3.2. Acumulação de íons inorgânicos .....	17
1.2.3.3. Acumulação de solutos orgânicos .....	18
1.2.3.4. Absorção de água e crescimento continuado .....	20
1.2.4. Respostas de cultivares ao estresse salino .....	20
1.3. HIPÓTESE .....	23
1.4. OBJETIVOS .....	23
1.4.1. Geral .....	23
1.4.2. Específicos .....	23
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24

<b><u>CAPÍTULO 2: RESPOSTA DE DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI</u></b>		
<b><u>AO NaCl DURANTE O ESTÁDIO DE GERMINAÇÃO DA</u></b>		
<b><u>SEMENTE E DO ESTABELECIMENTO DAS</u></b>		
<b><u>PLÂNTAS</u></b> .....		34
2.1.	INTRODUÇÃO .....	35
2.2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	36
2.2.1.	Material vegetal .....	36
2.2.2.	Condução dos Experimentos .....	37
2.2.2.1.	Germinação em condições controladas .....	37
2.2.2.2.	Germinação em condições de casa de vegetação .....	37
2.2.2.3.	Estabelecimento de plântulas em condições controladas .....	38
2.2.2.4.	Estabelecimento de plântulas em condições de casa de vegetação .....	39
2.2.3.	Determinações .....	39
2.2.3.1.	Porcentagem de germinação .....	39
2.2.3.2.	Índice de Velocidade de Germinação e Índice de Velocidade de Emergência .....	39
2.2.3.3.	Distribuição de Biomassa .....	40
2.2.3.4.	Curva de Embebição .....	40
2.2.3.5.	Acumulação e distribuição de Na <sup>+</sup> .....	40
2.3.	RESULTADOS .....	41
2.3.1.	Germinação em condições controladas .....	41
2.3.2.	Germinação em condições de casa de vegetação .....	48
2.3.3.	Estabelecimento de plântulas em condições controladas .....	48
2.3.4.	Estabelecimento de plântulas em condições de casa de vegetação .....	54
2.4.	DISCUSSÃO .....	57
2.4.1.	Germinação .....	57
2.4.2.	Estabelecimento das plântulas .....	60
2.5.	CONCLUSÃO .....	63
2.6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

<b><u>CAPÍTULO 3: CRESCIMENTO E PARTIÇÃO DE ÍONS EM PLÂNTULAS</u></b>	
<b><u>DE FEIJÃO-CAUPI [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.]</u></b>	
<b><u>SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO</u> ..... 67</b>	
3.1.	INTRODUÇÃO ..... 68
3.2.	MATERIAL E MÉTODOS ..... 70
3.2.1.	Plantio e condução das plântulas ..... 70
3.2.2.	Massa seca de folhas e raízes ..... 71
3.2.3.	Concentração de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> ..... 71
3.2.4.	Concentração de Cl <sup>-</sup> ..... 72
3.2.5.	Delineamento estatístico e análise dos dados ..... 72
3.3.	RESULTADOS ..... 73
3.3.1.	Crescimento ..... 73
3.3.2.	Conteúdos de Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> e K <sup>+</sup> ..... 78
3.4.	DISCUSSÃO ..... 83
3.5.	CONCLUSÃO ..... 85
3.6.	BIBLIOGRAFIA ..... 85
<b><u>CAPÍTULO 4: RESPOSTA OXIDATIVA INDUZIDA POR SALINIDADE</u></b>	
<b><u>EM DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.]</u></b>	
<b><u>..... 89</u></b>	
4.1.	INTRODUÇÃO ..... 90
4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS ..... 91
4.2.1.	Estratégia experimental e condições de semeio ..... 91
4.2.2.	Determinação da taxa de crescimento relativo da parte aérea 92
4.2.3.	Conteúdo relativo de água (C.R.A.) ..... 93
4.2.4.	Vazamento de eletrólitos ..... 94
4.2.5.	Concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ..... 94

4.2.6.	Extração e determinação das concentrações de proteínas solúveis .....	95
4.2.7	Atividade de dismutases de superóxido (SOD) (EC 1.15.1.1) .	96
4.2.8.	Atividade de catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) .....	96
4.2.9.	Atividade de peroxidases de ascorbato (APX) (EC 1.11.1.11)	97
4.2.10.	Atividade de peroxidases de fenóis (POX) (EC 1.11.1.7) .....	97
4.3.	RESULTADOS .....	98
4.4	DISCUSSÃO .....	106
4.5.	CONCLUSÃO .....	109
4.6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110
5.	CONCLUSÃO FINAL.....	114

## ABREVIATURAS

%G - Percentagem de germinação

%MS – Percentagem de massa seca

%VE – Percentagem de vazamento de eletróitos

$\cdot\text{OH}$  – Radical hidroxila

$^1\text{O}_2$  - Oxigênio singlete

6-BA – 6-benzil-adenina (auxina sintética)

ABA – Ácido abscísico

ACC – 1-aminociclopropano-1-carboxilato (precursor do etileno),

APX – Peroxidase de ascorbato

APX – Peroxidase de ascorbato (EC 1.11.1.1),

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina Sérica Bovina

C.R.A. – Conteúdo relativo de água

CAT – Catalase (EC1.11.1.6)

cv. – Cultivar

DAIT – Dias Após o Início do Tratamento

DAS - Dias após o semeio

DNA –Ácido desoxirribonucléico

EDTA – Etileno Diamino Tetracético

EROS - Espécies reativas de oxigênio

FAO – Food and Agriculture Organization

GPX – Peroxidase de glutathiona (GPX; EC 1.11.1.9),

GR – Redutase de glutathiona

$\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de Hidrogênio

IAA – Ácido indol-acético

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IVE - Índice de velocidade de emergência

IVG - Índice de velocidade de germinação

L – Leitura

LEA – Proteínas abundantes da embriogênese tardia

MDA – Aldeído Malônico

MDA-TBA – Complexo Aldeído Malônico – Ácido Tiobarbitúrico  
MF – Massa fresca  
MS – Massa seca  
Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHX1 – Sodium-hydrogen exchange  
NBT – Azul de *p*-nitro tetrazólio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Radical Superóxido  
P5C – Redutase da d-pirrolina-5-ácido carboxílico (P5C)  
PEG – Polietilenoglicol  
pH – Potencial de hidrogênio  
POX – Peroxidase de fenóis (EC 1.11.1.7),  
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro  
ROS - *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)  
Rubisco – Ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase  
SOD - Dismutase de superóxido (EC 1.15.1.1)  
SOS - *Salt Overly Sensitive*  
TBA – Ácido tiobarbitúrico  
TBARS – *TBA reactive species* (espécies reativas ao TBA)  
TCA – Ácido tricloroacético  
TCR – Taxa de crescimento relativo  
UA – Unidade de atividade  
UV – Ultra violeta

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2:** RESPOSTA DE DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI DURANTE O ESTÁDIO DE GERMINAÇÃO DA SEMENTE E DO ESTABELECIMENTO DAS PLÂNTAS

Tabela 1: Índice de velocidade de germinação das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamentos salinos em condições controladas. 43

Tabela 2: Índice de velocidade de emergência das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamento salino em condições de casa de vegetação. 49

Tabela 3: Razão entre parte aérea e sistema radicular de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamento salino em condições controladas. 52

Tabela 4: Razão entre parte aérea e sistema radicular das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamento salino em condições de casa de vegetação. 56

### **CAPÍTULO 3:** CRESCIMENTO E PARTIÇÃO DIFERENCIAL DE ÍONS EM PLÂNTULAS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO

Tabela 1: Análise de regressão do incremento de massa seca de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivares Pitiúba e Pérola, cultivadas na ausência (controle) e presença de 100 mM de NaCl, durante 8 dias. 77

Tabela 2: Análise de regressão do incremento de massa seca de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivares Pitiúba e Pérola, cultivadas na ausência (controle) e presença de 50, 100 e 200 mM de NaCl, durante 20 dias. 77

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 2:** RESPOSTA DIFERENCIAL AO NaCl DE DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] DURANTE A GERMINAÇÃO E O ESTABELECIMENTO DAS PLÂNTULAS

- Figura 1: Aspecto morfológico de sementes das cultivares Pérola (a, c, e, g, j) e Pitiúba (b, d, f, h, i) de feijão-caupi germinadas em condições controladas. As sementes foram submetidas a tratamento com água destilada deionizada (controle; a, b) ou NaCl 25 (c, d), 50 (e, f), 75 (g, h) e 100 mM (i, j) a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , no escuro, por 96 h. 42
- Figura 2: Porcentagem de germinação das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamentos salinos em condições controladas. 43
- Figura 3: Curvas de embebição de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi em água destilada deionizada (controle) ou NaCl 100 mM à temperatura ambiente. 44
- Figura 4: Conteúdo de massa fresca de eixos embrionários e cotilédones de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi germinadas sob tratamentos salinos em condições controladas. 46
- Figura 5: Conteúdo de massa seca de eixos embrionários e cotilédones de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi germinadas sob tratamentos salinos em condições controladas. 46
- Figura 6: Conteúdo de água de eixos embrionários e cotilédones de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi germinadas sob tratamentos salinos em condições controladas. 47
- Figura 7: Concentração de  $\text{Na}^{+}$ , em base de água de tecido, de eixos embrionários e cotilédones de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi germinadas sob tratamentos salinos em condições controladas. 47
- Figura 8: Porcentagem de germinação das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamento salino em condições de casa de vegetação. As sementes foram submetidas a tratamento com água destilada deionizada (controle) ou NaCl 100 mM a partir do segundo dia após a semeadura e permaneceram sob temperatura média de  $31^{\circ}\text{C}$  durante o dia e  $23^{\circ}\text{C}$  durante a noite, cerca de 55% de UR, fotoperíodo médio de 12 h e  $1400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por oito dias. 49
- Figura 9: Aspecto morfológico de plântulas das cultivares Pérola (acima) e Pitiúba (abaixo) de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas. Quatro dias após a semeadura, as plântulas foram submetidas a tratamento com água destilada deionizada (controle) ou NaCl 25, 50, 75 e 100 mM (da esquerda para a direita) a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 12 h e  $240 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por 48 h. 50
- Figura 10: Conteúdo de massa fresca de raízes, caule e folhas de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas. 51
- Figura 11: Conteúdo de massa seca de raízes, caule e folhas de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas. 51
- Figura 12: Conteúdo de água de raízes, caule e folhas de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas. 53



Figura 13: Concentração de Na<sup>+</sup> em raízes, caule e folhas de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas. 53

Figura 14: Conteúdo de massa fresca em raízes e parte aérea de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamento salino em condições de casa de vegetação. As sementes foram submetidas a tratamento com água destilada deionizada (controle) ou NaCl 100 mM a partir do segundo dia após a semeadura e permaneceram sob temperatura média de 31°C durante o dia e 23°C durante a noite, aproximadamente 55% de UR, fotoperíodo médio de 12 h e 1400 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> por oito dias. 55

Figura 15: Conteúdo de massa seca em raízes e parte aérea de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamento salino em condições de casa de vegetação. 55

Figura 16: Conteúdo de água (porcentagem de umidade) em raízes e parte aérea de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamento salino em condições de casa de vegetação. 56

### **CAPÍTULO 3: CRESCIMENTO E PARTIÇÃO DE ÍONS EM PLÂNTULAS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO**

Figura 1: Massa seca de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivar Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (controle) e 100mM de NaCl durante 8 dias. 75

Figura 2: Massa seca de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivar Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a níveis crescentes de NaCl durante 20 dias. 76

Figura 3: Conteúdo de sódio em tecidos de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivar Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (o) e 100mmol L<sup>-1</sup> (●) de NaCl durante 8 dias. 79

Figura 4: Conteúdo de sódio em folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivares Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (o) e 100mmol L<sup>-1</sup> (●) de NaCl, durante 20 dias. 80

Figura 5: Conteúdo de cloreto em tecidos de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivares Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (o) e 100mmol L<sup>-1</sup> (●) de NaCl durante 8 dias. 81

Figura 6: Conteúdo de potássio em tecidos de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivares Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (o) e 100mmol L<sup>-1</sup> (●) de NaCl durante 8 dias. 82

### **CAPÍTULO 4: RESPOSTA OXIDATIVA INDUZIDA POR SALINIDADE EM DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**

Figura 1: Aspecto visual das plantas de *V. unguiculata* cv. Pérola e Pitiúba no último dia de coleta (21 DAS). Distribuição das plantas no ambiente de câmara de crescimento [A]. Visão detalhada das plantas de cada tratamento [B]. Plantas mantidas sob condições normais de crescimento (Pérola – Controle e Pitiúba - Controle). Plantas mantidas sob tratamento com NaCl 100mM (Pérola – NaCl 100mM e Pitiúba – NaCl 100mM). 99

Figura 2: Taxa de Crescimento Relativo (A) e conteúdo relativo de água (B) de folhas de feijão-caupi cv. Pérola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM (■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 100

Figura 3: Percentual de vazamento de eletrólitos [A] e peroxidação de lipídios (TBARS) [B] de folhas de feijão-caupi cv. Pérola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM (■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 102

Figura 4: Teor de proteínas solúveis de folhas de feijão-caupi cv. Pérola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM (■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). 103

Figura 5: Atividade de enzimas dismutase de superóxido (SOD) [A] e catalase (CAT) de folhas de feijão-caupi cv. Pérola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM(■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). 104

Figura 6: Atividade de enzimas peroxidase de ascorbato (APX) [A] e peroxidase de fenóis (POX) de folhas de feijão-caupi cv. Pérola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM(■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). 105

# RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO ESTRESSE SALINO DE DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI

**Autor: JOÃO BATISTA SANTIAGO FREITAS**

**Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. da Silveira**

## RESUMO

O feijão-caupi, de origem africana, é uma das espécies mais importantes no Nordeste brasileiro, principalmente no aspecto social, como geradora de empregos e garantia de subsistência, utilizando mão-de-obra familiar e técnicas de cultivo, que vão das rudimentares às mais modernas. Não obstante, o feijão-caupi se desenvolve no semi-árido brasileiro sob condições ambientais adversas, nas quais predominam irregularidades hídricas, temperaturas elevadas e solos salinizados. O excesso de sais na solução do solo pode causar estresse osmótico nas culturas, pela redução do potencial hídrico do solo, e toxicidade iônica específica, em função do acúmulo excessivo de íons salinos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) no tecido vegetal. Os efeitos da salinidade sobre o metabolismo vegetal são complexos e atingem processos metabólicos associados ao déficit hídrico, desbalanço nutricional e iônico, comportamento estomático, eficiência fotossintética e capacidade de assimilação e alocação de carbono. Neste estudo, duas cultivares, (Pitiúba e Pérola) de feijão-caupi foram comparadas quanto a mecanismos fisiológicos ligados com a resistência ao estresse salino. Sementes de feijão-caupi das cultivares foram utilizadas após uma seleção entre 55 genótipos. A resistência destas cultivares ao estresse salino foi averiguada durante a germinação e o desenvolvimento inicial em condições controladas ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h,  $240 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e de casa de vegetação, nas quais as plantas foram submetidas a tratamentos com concentrações crescentes de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM). Em casa de vegetação, as irrigações foram baseadas em curva de absorção e retenção de água pelo substrato, mantendo-se a umidade equivalente à capacidade de campo (70%). Nos experimentos de germinação, os efeitos dos tratamentos salinos foram verificados sobre a massa fresca, massa seca, porcentagem de umidade, conteúdo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG). Durante o desenvolvimento inicial, massa fresca, massa seca, porcentagem de umidade, CRA e particionamento de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram determinados na planta completa, ao passo que a atividade de enzimas antioxidativas (SOD, CAT, APX e POX), %VE e TBARS foi determinada em folhas. As cultivares Pérola e Pitiúba apresentaram respostas diferenciais à salinidade causada pelo NaCl, especialmente durante a germinação. Apesar de apresentar maior conteúdo de reservas, a cultivar Pérola se mostrou mais sensível aos tratamentos salinos, possivelmente pela maior permeabilidade do tegumento, que permitiu rápida embebição e maior acúmulo de  $\text{Na}^+$ . Assim, os tecidos desta cultivar estariam mais propensos a sofrer danos de membrana e distúrbios metabólicos que os da cultivar Pitiúba. O conteúdo de  $\text{Na}^+$  em folhas da cultivar Pérola foi maior quando comparado com a cultivar Pitiúba. O estresse salino afetou

severamente o crescimento de feijão-caupi durante o estágio de estabelecimento das plântulas. Esta restrição de crescimento ocorreu associada ao acúmulo excessivo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nos diferentes órgãos, sem alterações significativas do conteúdo de  $\text{K}^+$ . Plantas de feijão-caupi apresentam caráter excludor de  $\text{Na}^+$  da parte aérea, acumulando este íon preferencialmente nas raízes. A cultivar Pitiúba acumulou mais  $\text{Cl}^-$  nas folhas e apresentou melhor performance de crescimento, indicando que o conteúdo de  $\text{Cl}^-$  acumulado nas folhas não atingiu concentrações tóxicas, e que a toxicidade iônica na espécie está associada principalmente ao  $\text{Na}^+$ . O efeito do NaCl no crescimento pode ser observado através da TCR das duas cultivares. As cultivares apresentaram redução da taxa de crescimento em torno de 70%, quando tratadas com NaCl 100 mM. Apesar do %VE ter sido aumentado devido ao tratamento salino em folhas, o conteúdo de TBARS sofreu aumento discreto. Além disso, as atividades de SOD, APX e POX foram aumentadas em ambas as cultivares, enquanto a atividade de CAT foi reduzida, indicando um possível efeito protetor dos tecidos foliares contra danos oxidativos. Assim, é provável que os danos fisiológicos causados por NaCl não foram, na sua maioria, causados por estresse oxidativo. Inversamente, o conteúdo de TBARS, juntamente com as atividades de SOD, CAT, APX e POX, podem não ser bons indicadores fisiológicos para explicar a intensidade dos danos oxidativos causados por NaCl em folhas de plantas de feijão-caupi. Contudo, a habilidade de folhas de feijão-caupi em resistir ao estresse oxidativo causado por salinidade, podem envolver diferentes vias de remoção de EROs.

# PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF TWO CONTRASTING CULTIVARS OF COWPEA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] TO SALT STRESS

Author: JOÃO BATISTA SANTIAGO FREITAS

Adviser: Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. da Silveira

## ABSTRACT

The cultivation of cowpea is fundamental in the Northeast of Brazil due to its social features in employment and subsistence. In this region, cowpea develops under adverse environmental conditions, including irregular precipitation, high temperatures and salinized soils. The excessive soil salinity could lower the soil water potential, causing osmotic stress in plants, as well as salt stress could induce ionic toxicity due to the accumulation of saline ions ( $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ) in the plant tissues. The effects of salinity in the plant metabolism are complex and include processes associated to water deficit, nutritional imbalance, photosynthetic efficiency and carbon assimilation and allocation. In this work, two cowpea cultivars were confronted in relation to physiological mechanisms associated to salt stress. Cowpea seeds of the Pérola and Pitiúba cultivars were selected to this work after a preliminary screening among 55 genotypes. The resistance of these cultivars against NaCl-salinity were assessed during the germination and the initial growth under controlled ( $27\pm 2^\circ\text{C}$ , photoperiod of 12 h,  $240 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and greenhouse conditions, subjecting plants to increasing external concentrations of NaCl (0, 25, 50, 75 and 100 mM). At greenhouse conditions, watering were performed according to the substrate field capacity (70%). In the germination assays, the effects of the salt treatments were assessed in fresh weight, dry weight,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$  content, germination percentage (%G) and germination velocity index (GVI). During the initial growth, fresh weight, dry weight, relative water content and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$  partitioning were determined in the whole plants, while electrolyte leakage, TBARS and the activity of antioxidative enzymes (SOD, CAT, APX e POX) were measured only in the leaves. The tested cultivars presented differential responses to NaCl-salinity, especially during seed germination. Although the Pérola seeds contained more food reserves, they appeared more sensible to the salt treatments, probably due to tegument permeability, which allowed fast imbibition and higher  $\text{Na}^+$  accumulation. Then, the tissues of Pérola seeds could be more exposed to membrane damages and metabolic disturbances caused by NaCl than that of the Pitiúba cultivar. Additionally, the salt treatments also affected severely the growth of both cultivars during the seedling establishment. This growth restriction was related to saline ion accumulation in the different organs of cowpea seedlings, without considerable changes in the  $\text{K}^+$  content. Cowpea seedlings excluded  $\text{Na}^+$  from the shoot and accumulated this ion preferentially in the roots. The Pitiúba seedlings accumulated more  $\text{Cl}^-$  in the shoot than that of the Pérola cultivar and presented better growth performance, indicating that the accumulated  $\text{Cl}^-$  probably did not reach toxic concentrations. Then, ionic toxicity in this species could be related more to  $\text{Na}^+$  than to  $\text{Cl}^-$  accumulation. Although the salt treatment induced

a considerable increase of the electrolyte leakage in cowpea leaves, it provoked only a slight augment of TBARS in these organs. In addition, the activity of SOD, APX and POX was increased in salt-treated plants of both cultivars, while the CAT activity was reduced, indicating a possible protective effect against oxidative damages in leaf tissue. In this way, it seems that the physiological disturbances caused by NaCl stress were not attributable to a secondary oxidative stress. Conversely, the TBARS content jointly with the activity of SOD, CAT, APX and POX could not be recommendable parameters to assess the oxidative damages caused by NaCl in cowpea leaves. Finally, the ability of cowpea leave to overcome salt-induced oxidative stress could involve different pathways of ROS scavenge.

## INTRODUÇÃO AO ESTUDO DE RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO

### **CAPÍTULO 1**

## 1.1. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Em praticamente todas as espécies culturas existem registros de que a salinidade e a deficiência hídrica podem se estabelecer como fatores limitantes da produção vegetal. Como fator prejudicial ao crescimento e desenvolvimento das plantas, a alta concentração de sais no solo ocasiona prejuízos econômicos e sociais, acarretando, muitas vezes, a inviabilidade de projetos agrícolas, desemprego e êxodo populacional. Nesse contexto, a busca por cultivares tolerantes e adaptadas à salinidade, ao lado do aprimoramento das técnicas de cultivo e da implementação de métodos de conservação do solo, vem sendo considerada como um dos principais desafios para fisiologistas e melhoristas de plantas.

Os solos considerados salinos, geralmente, contêm sais solúveis em quantidades suficientes para interferir no desenvolvimento da maioria das plantas cultivadas. Essa característica depende da espécie da planta, da textura, da capacidade de armazenagem de água no solo e da composição dos sais. Pesquisas envolvendo tolerância de plantas ao estresse salino avançam em várias frentes, pois, como afirma Bressan *et al.* (1998), o que distingue muitas espécies tolerantes das sensíveis é a habilidade de engajar toda a sua maquinaria de ajustamento a altas concentrações de sódio quando necessário. O estresse salino desorganiza a homeostase em termos de potencial hídrico e distribuição iônica. Essa desorganização da homeostase ocorre em níveis celulares e fisiológicos (Zhu, 2001).

A cultura do feijão-caupi é uma das mais importantes no Nordeste brasileiro, principalmente no aspecto social, como garantia de reserva de subsistência utilizando mão-de-obra familiar e técnicas simples de cultivo, bem como geradora de emprego e renda. Não obstante, o feijão-caupi está exposto aos problemas fisiológicos atribuídos a solos salinizados.

O estado do Ceará já foi o maior produtor brasileiro, responsável por um volume de, aproximadamente, 20% da produção total do país (Fundação IBGE, 1987). De acordo com Cardoso (2000), o feijão-caupi se desenvolve no semi-árido brasileiro, em geral, sob condições ambientais adversas, principalmente deficiência hídrica, temperaturas elevadas e salinização dos solos. Além disso, em algumas regiões produtoras, há um emprego crescente da utilização da irrigação nessa cultura, o que aumenta consideravelmente os riscos de salinização dos solos devido



a problemas com a qualidade da água usada para irrigação, associado com as condições edáfico-climáticas propícias ao aumento da salinização. Hernández *et al.* (1995) classificam o feijão-caupi como uma planta moderadamente sensível à salinidade.

Neste estudo procurou-se caracterizar comparativamente mecanismos fisiológicos ligados com a tolerância ao estresse salino, em duas cultivares (Pérola e Pitiúba) de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. Trabalhou-se com a hipótese de que diferenças na resistência ao excesso de sais entre cultivares estão relacionadas diretamente com os efeitos diferenciais sobre processos fisiológicos chaves como germinação, crescimento, compartimentalização de íons salinos e proteção oxidativa contra espécies reativas de oxigênio geradas pela salinidade.

## 1.2. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1. A cultura do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]

O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata*, é uma leguminosa de alto valor protéico, também conhecido como feijão-de-macassar, feijão-fradinho ou feijão-de-corda. É encontrada como complementação do hábito alimentar nordestino, que dedica importância em muitos de seus pratos típicos (Mafra, 1979). O oeste da África é o maior centro de diversidade do feijão-caupi domesticado e a Índia aparece como um centro secundário de diversidade, onde ocorreu significativa variabilidade desde a sua introdução no continente, durante o Neolítico (Ehlers e Hall, 1997).

A cultura está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo tanto em formas selvagens como cultivadas (Maréchal *et al.*, 1978). O seu centro de origem tem por referência o continente africano, sendo introduzida nas Américas em meados do séc. XVII pelos espanhóis, durante o tráfico de escravos. A área de produção global é cerca de 12 milhões de hectares, sendo que a África Ocidental e Central ocupam cerca de 8 milhões de hectares, e América do Sul e Central participam com 2,4 milhões (Quin, 1997), alcançando uma produção de cerca de 3 milhões de toneladas anuais, em média (Singh *et al.*, 1997).

O feijão-caupi é uma *Dicotyledonea*, que pertence à divisão *Magnophyta*, classe *Magnoliopsida*, subclasse *Rosidae*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae*,

subfamília *Papilionoideae*, gênero *Vigna* (Freire-Filho, 1988; Cardoso, 2000). No Brasil, o feijão-caupi constitui a leguminosa mais importante das regiões Norte e Nordeste (Ehlers e Hall, 1997). O Ceará, juntamente com os Estados do Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte constituem importantes produtores da Região Nordeste, enquanto que o Amazonas e Pará destacam-se como grandes produtores da região Norte (Fundação IBGE, 1987). Apresenta-se como uma cultura de subsistência, sendo, principalmente, uma fonte de proteína para a população camponesa. Também é utilizado para a produção de feno, visando a nutrição protéica dos animais, bem como opção para fixação de nitrogênio e incorporação de matéria orgânica em solos, uma vez que é capaz de se desenvolver em situações de baixa fertilidade (Oliveira e Carvalho, 1988).

Dentre os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade do feijão-caupi destacam-se a situação econômica do produtor, sementes não melhoradas geneticamente, ausência de preparo e correção do solo e falta de manejo adequado para a cultura. Os solos das regiões onde o feijão-caupi é cultivado no Brasil possuem limitações de fertilidade, além de apresentarem problemas como salinidade no Nordeste e altos níveis de alumínio no Norte. O baixo teor de fósforo é um fator limitante da fertilidade desses solos, enquanto nitrogênio, caso haja condições de pH e alumínio favoráveis, pode ser suprido simbioticamente à cultura, que nodula eficientemente com numerosas estirpes de rizóbio presentes no solo (Cardoso, 2000).

Apesar de essa espécie apresentar excelentes características de tolerância para condições de deficiência hídrica, estresse salino e extremos de temperatura, evidentemente, o feijão-caupi responde com maior produtividade em condições ideais de disponibilidade de água, nutrição e temperatura. Assim, pesquisas de melhoramento vêm sendo desenvolvidas visando ao aumento da resistência desta cultura às condições de seca e salinidade do semi-árido nordestino (Martins Miranda, 2002). Embora, o feijão-caupi apresente excelentes respostas às condições de estresse ambiental (abiótico) e possua grande potencial de ajustamento a essas condições, são ainda relativamente recentes e escassos os trabalhos encontrados na literatura sobre o comportamento fisiológico, efeitos e mecanismos bioquímicos referentes à tolerância ao estresse hídrico e à salinidade.

### 1.2.2. Salinidade e seus efeitos nas plantas

Os solos considerados salinos contêm sais solúveis em quantidades suficientes para interferir no desenvolvimento da maioria das espécies cultivadas. Obviamente, não é possível referir-se a uma determinada quantidade de sais, pois a situação depende da espécie da planta, da textura do solo, da capacidade de armazenagem de água no solo e da composição dos sais (Meneses Júnior, 2002). Os sais solúveis consistem, normalmente de várias proporções dos cátions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e dos ânions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e, às vezes de  $\text{K}^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{NO}_3^-$ . As principais alterações químicas provocadas pela salinização dos solos são na composição e balanço de cátions nos complexos de troca e na solução do solo, com reflexos no pH e na capacidade de troca iônica e disponibilidade de nutrientes (Santos e Muraoka, 1997). O problema da salinidade existe quando os sais acumulam-se na zona radicular em uma concentração tal que não permita que a planta retire água suficiente, provocando, assim, estado de deficiência de água por tempo significativo, que pode se estender até causar sintomas na planta muito semelhantes aos provocados pela estiagem (Ayers e Westcot, 1991).

A salinização dos solos tem origem diversa, sendo que, entre os fatores naturais, os mais importantes são o material de origem e o clima. No primeiro caso, a intemperização química dos minerais e rochas da crosta terrestre é a principal fonte responsável pela liberação e distribuição de íons (Daker, 1988). Assim, o halomorfismo naturalmente induzido ao solo é conseqüência de processos pedogenéticos específicos. A concentração salina da solução do solo, antes da ação antrópica, é definida como salinização primária. A salinização induzida é decorrente do manejo inadequado do solo e da água em práticas agrícolas (Santos e Muraoka, 1997). As áreas naturalmente salinas do mundo compreendem aquelas que são constantemente inundadas pelas águas salgadas de lagos e, principalmente, dos mares (áreas de manguezais nas costas tropicais e subtropicais), os desertos salinos e pequenas áreas próximas a depósitos de sais (Chapman, 1975; Cardoso, 2000). Também influencia na salinização dos solos a dependência da relação entre infiltração e evaporação. Se a infiltração for maior, os solos são lixiviados e, com facilidade se acidificam. Se a evaporação predomina, ocorre o contrário, acumulam-se sais na camada superior dos solos e, com facilidade se salinizam. Para salinizar um solo não é necessária água salina no subsolo, nem calor muito grande. A água

doce contém sais e, como em zonas áridas a água do subsolo sobe e evapora, ou é absorvida pelas plantas, falta o movimento descendente. A água deposita seus sais excedentes na camada superficial do solo e, com o tempo, estes se acumulam, tornando salinos os solos do semi-árido. Isso ocorre tanto mais rapidamente quanto mais alto for o nível freático (Primavesi, 1987).

Os principais efeitos da salinidade dos solos na redução do crescimento em plantas expostas são: (i) redução na disponibilidade de água, causada pela redução do potencial hídrico no solo e (ii) o efeito tóxico sobre o metabolismo celular e fisiológico pelo acúmulo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nos tecidos. A queda no potencial hídrico do solo explica a redução na transpiração e na assimilação de fotossintatos. O turgor da parte aérea também é normalmente afetado, impedindo a expansão de folhas mais jovens. Muitos autores acreditam que o turgor é a principal força que impele a expansão celular nos tecidos em crescimento, e, em situações de salinidade, a expansão foliar decresce com a limitação da disponibilidade de água (Amzallag, 1997; Zhu, 2001). Evidências experimentais mostram que a pressão osmótica das folhas em crescimento é regulada em função do ajustamento da pressão osmótica externa (Cheeseman, 1988; Lauter *et al.*, 1988).

### **1.2.2.1 Efeitos da salinidade sobre a germinação e estabelecimento de plântulas**

O efeito do estresse salino sobre a germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas tem sido exaustivamente estudado tanto em espécies cultivadas (Redmann, 1972; Prisco e Vieira, 1976; Prisco *et al.*, 1981; Hampson and Simpson, 1989; Al-Niemi *et al.*, 1992; Huang and Redmann, 1995; Wahid *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2003; Misra e Dwivedi, 2004; Joshi *et al.*, 2005) quanto em espécies nativas (Khan e Ungar, 1984; Myers e Morgan, 1989; Katembe *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Gulzar e Khan, 2001; Ramoliya e Padey, 2002; Ramoliya e Padey, 2003; Ye *et al.*, 2005).

O estresse salino inibe ou retarda a germinação das sementes e o crescimento das plântulas devido a efeitos osmóticos e/ou iônicos. O primeiro distúrbio fisiológico causado pelo estresse salino é a restrição da captação de água devido à diminuição do potencial osmótico do substrato, retardando a embebição das sementes ou o alongamento da raiz (Redmann, 1972; Wahid *et al.*, 1998; Croser

*et al.*, 2001; Ramoliya e Padey, 2002; Ramoliya e Padey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2005). Durante o estabelecimento das plântulas, a captação de água acarreta a acumulação de íons, principalmente no eixo embrionário (Wahid *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2003). Ao atingir concentrações tóxicas, os íons acumulados podem afetar vários processos fisiológicos e metabólicos dos tecidos embrionários, incluindo a divisão celular, a diferenciação celular, a atividade de enzimas e a captação e distribuição de nutrientes (Wahid *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Ramoliya e Padey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003; Misra e Dwivedi, 2004). Assim, a toxicidade iônica pode ocasionar o atraso da emergência das plântulas (Wahid *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Ramoliya e Padey, 2002; Ramoliya e Padey, 2003; Joshi *et al.*, 2005) e da mobilização das reservas (Wahid *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2003; Prisco e Vieira, 1976; Prisco *et al.*, 1981) ou até diminuir a viabilidade das sementes (Wahid *et al.*, 1998; Ramoliya e Padey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003) ou aumentar a mortalidade das plântulas (Croser *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2005).

Para esclarecer os mecanismos envolvidos com os efeitos do estresse salino verificados durante ou após a germinação, muitos trabalhos têm focado a interferência de tratamentos salinos sobre processos fisiológicos ou metabólicos específicos, como a mobilização de reservas (Prisco e Vieira, 1976; Prisco *et al.*, 1981; Ashraf *et al.*, 2003), expressão gênica (Ramagopal, 1987; Ramagopal, 1990; Dell'Aquila e Spada, 1993; Dell'Aquila, 2000), o metabolismo de espécies reativas de oxigênio (Sreenivasulu *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2005), a captação de nutrientes (Ashraf *et al.*, 2003; Ramoliya *et al.*, 2004), o metabolismo hormonal (Zapata *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005) e a acumulação de solutos compatíveis (Thakur e Sharma, 2005).

Em plântulas de feijão-caupi tratadas com NaCl, foi verificado retardo na mobilização de proteínas de reserva (Prisco e Vieira, 1976) e de amido (Prisco *et al.*, 1981) em cotilédones. Como as plântulas tratadas não apresentaram diminuição da atividade proteolítica em relação às plântulas controle, o retardo na mobilização de proteínas provavelmente foi influenciado pela translocação reduzida dos produtos de hidrólise (Prisco e Vieira, 1976). Além disso, as plântulas tratadas mostraram diminuição da atividade de amilases em comparação com as plântulas controle, bem como redução da translocação dos produtos de hidrólise (Prisco *et al.*, 1981). Assim, parece que a mobilização de reservas em cotilédones de feijão-caupi pode ser

regulada por mecanismos do tipo fonte-dreno, os quais sofrem influência da salinidade causada por NaCl.

Adicionalmente, plântulas de girassol tratadas com concentrações externas crescentes de NaCl apresentaram retardo na mobilização de lipídeos de reserva em cotilédones (Ashraf *et al.*, 2003). É possível que o retardo na mobilização de lipídeos tenha contribuído para a redução do crescimento do eixo embrionário pela diminuição do fornecimento de açúcares solúveis produzidos por gliconeogênese.

Alguns estudos demonstram que a salinidade causada por NaCl acarreta a expressão diferencial de genes durante a germinação e o estabelecimento das plântulas em nível de RNAm (Ramagopal, 1987) e em nível de proteína (Ramagopal, 1990; Dell'Aquila e Spada, 1993; Dell'Aquila, 2000). Em plântulas de cevada sob tratamento salino, a cultivar considerada sensível expressou RNAm específicos na parte aérea, enquanto a cultivar considerada resistente expressou RNAm específicos em raízes (Ramagopal, 1987). Em embriões de cevada (Ramagopal, 1990) e trigo (Dell'Aquila e Spada, 1993), a síntese de proteínas foi fortemente reduzida sob tratamento salino, apresentando aumento rápido em tratamento de recuperação. Durante o tratamento salino, a síntese de proteínas envolvidas com a emergência da radícula foi reduzida, mas ocorreu a síntese de proteínas induzidas por NaCl, as quais foram mais expressas em cultivares consideradas resistentes. Em tratamento de recuperação, a síntese de proteínas relacionadas com as fases avançadas da germinação foi retomada tanto nas cultivares sensíveis quanto nas resistentes (Ramagopal, 1990; Dell'Aquila e Spada, 1993).

Durante a germinação de sementes de cevada sob tratamento salino, ocorreu expressão prolongada de um gene que codifica para uma proteína conhecida como germina, a qual corresponde a uma oxalato oxidase (Hurkman e Tanaka, 1996). A expressão foi mais intensa na raiz e na região vascular do colo e foi estimulada por NaCl, ácido indol-acético (IAA) e ácido abscísico (ABA). Assim, é possível que a expressão de germina esteja relacionada com o metabolismo oxidativo durante a germinação sob tratamento salino, devido à atividade de oxalato oxidase da germina.

Plântulas de arroz tratadas com NaCl sofreram parada de crescimento e expressaram seis proteínas abundantes da embriogênese tardia (proteínas LEA) (Chourey *et al.*, 2003). Em adição, o crescimento das plântulas foi retomado e estas

proteínas foram degradadas durante tratamento de recuperação. Desta forma, a salinidade causada pelo NaCl induziu a expressão de proteínas LEA, as quais podem estar associadas à parada de crescimento das plântulas.

Plântulas submetidas ao estresse salino também podem sofrer danos oxidativos causados por alterações no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (Sreenivasulu *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2005). Sreenivasulu *et al.* (1999) estudaram a peroxidação de lipídeos, a expressão e a atividade de peroxidases em plântulas de duas cultivares de *Setaria italica* tratadas com NaCl. As plântulas da cultivar considerada resistente apresentaram menor peroxidação de lipídeos e maior atividade de peroxidase que as plântulas da cultivar considerada sensível sob tratamento salino. As plântulas da cultivar resistente também expressaram uma isoforma específica de peroxidase ácida, a qual pode apresentar algum papel importante na homeostase redox durante o estresse salino. Além disso, Tsai *et al.* (2005) verificaram alterações na expressão e na atividade de ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) em raízes de plântulas de arroz submetidas a tratamentos com NaCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ambos os tratamentos causaram aumento do conteúdo endógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associado a um aumento da atividade de APX e GR. No entanto, apenas o tratamento com NaCl foi capaz de induzir a expressão destas enzimas, indicando que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não deve atuar como sinalizador.

A exposição de plântulas em estabelecimento ao estresse salino acarreta distúrbios na captação e na distribuição de nutrientes (Ashraf *et al.*, 2003; Ramoliya *et al.*, 2004). Em plântulas de girassol expostas a concentrações externas crescentes de NaCl, ocorreu acúmulo de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> em cotilédones e principalmente em eixo embrionário (Ashraf *et al.*, 2003). Em contrapartida, ocorreu diminuição do conteúdo de K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> em eixo embrionário, provavelmente associado a translocação reduzida destes íons a partir dos cotilédones. Assim, a salinidade causada por NaCl pode ter prejudicado o crescimento das plântulas de girassol pela interferência na redistribuição de K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> oriundos dos cotilédones. Adicionalmente, plântulas de *Salvadora persica* expostas ao estresse salino apresentaram diminuição do conteúdo de nitrogênio, fósforo, magnésio, zinco e ferro em raízes, caule e folhas, assim como diminuição do conteúdo de potássio e manganês em raízes durante o tratamento (Ramoliya *et al.*, 2004). Neste caso, o solo salinizado com cloretos e sulfatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio causou distúrbios tanto na captação quanto na distribuição de macro e micronutrientes.

Existem evidências de que o estresse salino provoca alterações no metabolismo hormonal de plântulas em estabelecimento (Zapata *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005). Sementes de alface germinadas sob tratamento salino apresentaram aumento da taxa de respiração e da evolução de etileno, além de alterações no balanço de poliaminas (Zapata *et al.*, 2003). Assim, a evolução de etileno e a síntese das poliaminas espermidina e espermina podem estar associadas à resistência ao estresse salino. Além disso, a germinação de sementes de *Suaeda salsa* sob tratamentos salinos foi estimulada por 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC, precursor do etileno), GA<sub>4</sub> (giberelina) e 6-benzil-adenina (6-BA, auxina sintética). Novamente, a evolução de etileno parece ter algum papel na resistência ao estresse salino. É provável que ACC, GA<sub>4</sub> e 6-BA tenham um efeito promotor da germinação atuando como antagonistas do ABA, cuja síntese é induzida sob estresse salino.

Em plantas expostas ao estresse salino, a acumulação de solutos compatíveis, como prolina, tem sido relacionada ao ajustamento osmótico dos tecidos, além da estabilização de proteínas e da eliminação de espécies reativas de oxigênio (Thakur e Sharma, 2005). Em sementes de sorgo tratadas com NaCl foi verificado retardo da germinação acompanhado da acumulação de prolina. Talvez a acumulação de prolina tenha algum papel como sinalizador durante a germinação sob estresse salino, evitando o estabelecimento das plântulas em condições ambientais pouco favoráveis ao crescimento.

Desta forma, o conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos com os efeitos do estresse salino durante a germinação e o estabelecimento de plântulas permanece bastante fragmentado. Estudos mais aprofundados, utilizando técnicas avançadas de bioquímica e biologia molecular, podem auxiliar na construção de um panorama mais amplo e completo sobre estes mecanismos, possibilitando futuras aplicações biotecnológicas deste conhecimento.

Em muitos trabalhos realizados com espécies cultivadas, os autores consideram as cultivares testadas como sensíveis ou resistentes ao estresse salino de acordo com as respostas fisiológicas apresentadas no decorrer ou após a germinação. Redmann (1972) estudou a germinação de três cultivares de alfafa submetidas ao estresse osmótico promovido por polietilenoglicol (PEG) e manitol e ao estresse salino causado por NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e MgSO<sub>4</sub>. Este autor utilizou a porcentagem de germinação como critério para discriminar as cultivares testadas como sensíveis ou resistentes a estes estresses. Al-Niemi *et al.*



(1992) verificaram o efeito de concentrações externas crescentes de NaCl sobre a germinação e o crescimento inicial de 86 cultivares de alfafa. Estes autores verificaram alterações na porcentagem de germinação, na altura das plântulas, no número de ramos por plântula, na massa seca de raízes e parte aérea e na razão entre a parte aérea e as raízes. Cultivares consideradas resistentes durante a germinação, devido a maiores porcentagens de germinação sob estresse salino, não necessariamente geraram plântulas consideradas mais resistentes, ou seja, com maior massa seca na parte aérea ou maior número de ramos.

Huang e Redmann (1995) compararam o desempenho de três cultivares de cevada sob estresse osmótico promovido por PEG e estresse salino causado por NaCl ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + MgSO<sub>4</sub>, verificando a porcentagem e o índice de velocidade de germinação, além do comprimento das raízes e da parte aérea das plântulas obtidas. De acordo com estes parâmetros, as cultivares testadas apresentaram maior sensibilidade ao estresse osmótico, seguido do estresse salino causado por NaCl, tanto no decorrer da germinação quanto durante o estabelecimento das plântulas. Wahid *et al.* (1998) estudaram o efeito do pré-tratamento com NaCl sobre o estabelecimento de plântulas de uma cultivar de sorgo. Mesmo sendo considerada moderadamente resistente ao estresse salino, esta cultivar apresentou plântulas com redução no conteúdo de massa fresca e massa seca e com aumento do conteúdo de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, prolina e açúcares livres, conforme o aumento da concentração externa de NaCl.

Finalmente, Misra e Dwivedi (2004) compararam duas cultivares de *Phaseolus aureus* submetidas a tratamentos com concentrações externas crescentes de NaCl durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas. A cultivar considerada sensível apresentou menor porcentagem de germinação, assim como menores conteúdos de massa fresca, massa seca e água que a cultivar considerada resistente em NaCl 50 mM. Adicionalmente, a cultivar considerada sensível apresentou maior acúmulo de Na<sup>+</sup> e menor acúmulo de K<sup>+</sup> em raízes e parte aérea. Assim, é provável que a sensibilidade ou a resistência ao estresse salino durante o desenvolvimento inicial sejam características expressas pelas cultivares em determinados momentos desta fase do desenvolvimento.

Estudos preliminares sobre efeitos fisiológicos da salinidade causada por NaCl sobre o desenvolvimento inicial de espécies cultivadas têm o mérito de identificar cultivares que apresentam possíveis mecanismos de resistência ao

estresse salino. A classificação categórica de cultivares como sensíveis ou resistentes baseada somente em testes pontuais pode não refletir o desempenho potencial destas cultivares ao longo do seu ciclo de vida. Desta forma, a seleção inequívoca de cultivares resistentes ao estresse salino e sua utilização em práticas agrícolas requer estudos fisiológicos e bioquímicos aprofundados. As cultivares testadas devem ser avaliadas ao longo do seu ciclo de vida por meio de parâmetros que indiquem não apenas seu desempenho no estabelecimento, no crescimento e na produção, mas que também identifiquem mecanismos de resistência importantes para futuros programas de melhoramento genético.

#### **1.2.2.2. Efeito osmótico e deficiência hídrica induzida**

Modificações no *status* hídrico imposto pela salinidade influenciam marcadamente nas respostas na taxa de crescimento foliar de plantas submetidas a estresse salino. A redução no potencial hídrico da solução nutritiva pode causar interrupção do influxo de água ou uma redução da turgescência celular na epiderme da raiz (Cramer e Bowman, 1991). De maneira geral, a inibição do crescimento das plantas pelo estresse salino pode ser conseqüência dos efeitos osmóticos, provocando déficit hídrico e/ou acumulação exagerada de íons, causando desequilíbrios nutricionais e toxicidade (Cusido *et al.*, 1987; Boursier e Läuchli, 1990).

De acordo com Munns *et al.* (2002), o estresse salino impõe efeitos característicos em glicófitas em geral, conhecido como *Resposta Bifásica*. A primeira fase de redução do crescimento é aparente, sendo atribuída ao sal do meio externo. Nesta fase prevalece o componente osmótico, para a qual existe uma variação genotípica surpreendentemente pequena, e o crescimento seria regulado, presumidamente, por sinais hormonais provenientes das raízes (Azevedo Neto, 2005). Então, impõe-se uma segunda fase de redução no crescimento, resultando em dano interno. À medida que as células são expostas ao NaCl, o fluxo de carbono pode ser alterado para atender à biossíntese de solutos osmóticos e a geração de energia necessária para esta biossíntese, além de outros processos importantes para o ajustamento osmótico (Binzel *et al.*, 1985). Esta segunda fase é a que separa claramente espécies e genótipos que diferem na habilidade para tolerar a salinidade (Munns *et al.*, 2002).

### 1.2.2.3. Efeitos iônicos e toxicidade

As altas concentrações de sais no solo causam um estresse hiperiônico (excesso de íons tóxicos) e a consequência deste estresse juntamente ao estresse osmótico acaba por ser altamente danosa à planta. O estresse iônico causa um desequilíbrio de íons, não somente de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , mas também de  $\text{K}^+$  e de  $\text{Ca}^{2+}$  (Yeo, 1998; Chen e Plant, 1999; Zhu, 2001). Em substratos salinos o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  são, freqüentemente, os íons dominantes. Apesar da necessidade de  $\text{Cl}^-$  como micronutriente para as plantas superiores e do  $\text{Na}^+$  para muitas halófitas e algumas espécies  $\text{C}_4$ , a concentração de ambos os íons em substratos salinos excede esta demanda e leva a toxicidade em plantas não tolerantes ao sal. Em diversas culturas herbáceas e frutíferas a inibição do crescimento e a injúria à folhagem (cloroses marginais e necroses nas folhas maduras) ocorrem mesmo em baixos níveis de salinização de NaCl (Maas, 1993).

Embora a toxicidade ao  $\text{Cl}^-$  seja muito comum em muitas espécies de plantas cultivadas em substratos salinos em algumas espécies de plantas, tais como o sorgo, comparado ao cloreto (NaCl), a salinização com o sulfato ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) pode reduzir o crescimento do mesmo modo que o NaCl em baixas concentrações. Esse decréscimo no crescimento é, em parte, devido à redução na concentração de potássio e magnésio em salinização elevada com sulfato (Boursier e Läuchli, 1990). Com exceção de algumas gramíneas tal como o trigo, sorgo e arroz, a toxicidade do  $\text{Na}^+$  não parece ser tão acentuada quanto à do  $\text{Cl}^-$  e está mais relacionada à baixa concentração de cálcio ou aeração deficiente no substrato. Diversas culturas com baixa tolerância ao sal são “excludoras” de  $\text{Na}^+$  e capazes de restringir, em níveis baixos e moderados de salinidade, o transporte de  $\text{Na}^+$  para as folhas, onde ele é altamente tóxico em espécies sensíveis ao sal. (Yeo *et al.*, 1977).

### 1.2.2.4. Estresse oxidativo

A adaptação ao estresse abiótico, particularmente imposto por restrição hídrica e salinidade, tem sido geralmente vista, em plantas, em termos de ajustamento osmótico e regulação do conteúdo iônico. Entretanto, um número crescente de estudos tem revelado que estresse abiótico também pode induzir estresse oxidativo (Borsani *et al.*, 2001; Rout e Shaw, 2001). O estresse oxidativo

tem sido constatado em plantas expostas a temperaturas extremas, particularmente em combinação com altas intensidades luminosas, estresse hídrico, seca, salinidade, exposição a ozônio, luz UV e herbicidas (Inzé e Van Montagu, 1995).

No oxigênio molecular (oxigênio tríplete), dois elétrons em orbitais de maior energia estão desemparelhados, apresentando spins contrários. Tal configuração determina ao oxigênio uma capacidade reativa fora do comum, refletindo-se em uma característica essencial nos organismos aeróbicos, como fonte de acepção de elétrons das cadeias transportadoras, mas também mostrando uma potente força oxidante sobre macromoléculas e organelas, quando em altas concentrações intracelulares, geralmente evidenciadas em situações de estresse e desequilíbrio da homeostase celular (Foyer e Noctor, 2000). A excitação do oxigênio tríplete para o sínglete leva à formação de intermediário com energia livre suficiente para levar à formação de diversas espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS). Eles resultam tipicamente da transferência de um, dois ou três elétrons do O<sub>2</sub> para formar, respectivamente, um radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou um radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) (Mittler, 2002). Superóxido e peróxido de hidrogênio podem inativar várias moléculas diretamente, mas é a sua conversão a OH<sup>-</sup> catalisada por metais de transição, mormente o Fe<sup>3+</sup> (reação de Haber-Weiss), que contribui para sua principal toxicidade. Esses radicais também reagem instantaneamente com proteínas, lipídios e DNA, causando dano celular (Scandalios, 2002).

Por outro lado, ROS também têm importância em diversos aspectos do metabolismo celular. Em fisiologia do parasitismo (estresse causado por patógeno), a resposta hipersensitiva caracteriza a formação de lesões necróticas no sítio de infecção. Similarmente ao que é observado na ação de macrófagos durante a resposta imune de animais, um dos eventos iniciais da resposta hipersensitiva é a acumulação de intermediários ROS e óxido nítrico (Delledone *et al.*, 2002). Além disso, o peróxido de hidrogênio, por exemplo, participa positivamente de várias outras atribuições metabólicas da planta: sinalização sistêmica, processos de morte celular programada mediados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fechamento estomático mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ABA, metabolismo do gravitropismo radicular, sinalização a *downstream* e expressão de genes (Neill *et al.*, 2002).

Plantas tolerantes a NaCl, além de serem capazes de regular movimentos de água e de íons na condição de estresse, também podem possuir um eficiente

sistema de defesa contra o estresse oxidativo, pela efetiva remoção de ROS. Enzimas antioxidativas são os principais componentes em sistemas antioxidativos em plantas e são largamente responsáveis pela remoção de ROS (Hoekstra *et al.*, 2001).

As plantas possuem um número de enzimas antioxidativas que as protegem contra danos causados por ROS, tais como as dismutases de superóxido (EC1.15.1.1), que metaboliza o superóxido ( $O_2^-$ ); as catalases (EC1.11.1.6.) e uma variedade de peroxidases (EC1.11.1.7), que removem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Breusegem *et al.*, 2001). Como as SODs, as CATs e as POXs são importantes enzimas do sistema de defesa das plantas contra ROS, o aumento da atividade dessas enzimas pode ser considerado uma evidência circunstancial da produção de espécies reativas de oxigênio (Cakmak e Horst, 1991) e, o que é mais importante, da tentativa da planta em evitar os danos oxidativos promovidos por eles. De acordo com Polle (2001), o ciclo do ascorbato-glutationa é uma via eficiente de células de planta que dispõem de  $H_2O_2$  em determinados compartimentos onde este metabólito é produzido e não existe catalase presente. Este ciclo faz uso dos antioxidantes não enzimáticos como o ascorbato e a glutathione em uma série de reações catalisadas por quatro enzimas antioxidativas, e está bem demonstrado em cloroplastos, citosol e mitocôndrias de nódulos radiculares (Foyer e Mullineaux, 1994).

### **1.2.3. Principais respostas adaptativas das plantas ao estresse salino**

Mecanismos de sobrevivência da planta em ambientes estressantes foram desenvolvidos ao longo da evolução. Entretanto, o melhoramento de espécies cultivadas visando à produção agrícola tem freqüentemente disponibilizado material sensível ao estresse abiótico, uma vez que a maioria das adaptações de planta às condições de estresse resulta na redução da taxa líquida da fotossíntese e, conseqüentemente, na baixa produtividade da cultura (Prisco, 1989; Turner, 1986). Vale salientar que, segundo Azevedo Neto (2005), *aclimação* das plantas resulta do aumento da capacidade das plantas sobreviverem a condições adversas, em decorrência de modificações fisiológicas temporárias provocadas por mudanças ambientais; ou seja, uma alteração fisiológica. Por outro lado, *adaptação* é o aumento da capacidade das plantas sobreviverem a condições adversas, em

decorrência de alterações morfofisiológicas definitivas provocadas pela seleção evolucionária (natural ou artificial) de genes.

### 1.2.3.1. Compartimentalização de íons tóxicos

Sob estresse salino, um fator preponderante na acumulação de substâncias em células vacuoladas é a compartimentalização subcelular. À medida que quantidades excessivas de íons entram no citoplasma, eles inibem as atividades de muitas enzimas. Um mecanismo de proteção importante é a compartimentalização desses íons no vacúolo, onde contribuirão para o ajustamento osmótico sem afetar os sistemas enzimáticos do citoplasma. Nestas células, o balanço hídrico entre o vacúolo e o citoplasma é mantido pela síntese e acúmulo de compostos orgânicos (Taiz e Zaiger, 2004).

A homeostase iônica é fundamental para a fisiologia das células vivas. A regulação do influxo/efluxo de íons faz-se necessária para as células manterem as concentrações de íons tóxicos baixa e para acumular íons essenciais. As células vegetais empregam transporte ativo primário, mediado por  $H^+$ -ATPases, e transporte secundário, mediado por canais e co-transportadores, para manter altas concentrações de  $K^+$  e baixas concentrações de  $Na^+$  no citosol (Soares, 2005). Em geral, o cajueiro apresenta baixa tolerância ao estresse salino e a toxicidade com  $Cl^-$  é a principal causa da redução do crescimento em baixos níveis salinos. Ao contrário do  $Cl^-$  o transporte do  $Na^+$  para a parte aérea da planta é bastante restrito no feijoeiro. Portanto, o cajueiro, assim como muitas outras culturas sensíveis ao sal, é um eficiente excludor de  $Na^+$  mas não de  $Cl^-$  (Meneses Júnior, 2002).

Plantas podem ser consideradas “includoras” ou “excludoras” de íons, considerando seu ambiente intracelular. Plantas “excludoras” necessitam ter mecanismos para evitar um déficit hídrico de dentro para fora. A adaptação por meio da inclusão pode ocorrer através de uma alta tolerância ao  $Na^+$  e  $Cl^-$ , ou evitando-se altas concentrações salinas no tecido. Embora possa se fazer uma distinção clara entre “includoras” e “excludoras” de sais, existe, na realidade, um espectro contínuo de diferentes graus de inclusões e exclusões, entre  $Na^+$  e  $Cl^-$  e entre diferentes partes e órgãos das plantas. Na beterraba a tolerância se baseia, principalmente, na inclusão de sais e sua utilização para manutenção do turgor ou na substituição do  $K^+$  pelo  $Na^+$  em várias funções metabólicas (Gorham *et al.*, 1985). O crescimento

aumenta com a salinidade e os níveis de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  aumentam nos tecidos mas os níveis de  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  diminuem devido à competição catiônica. Nas glicófitas o mecanismo predominante é o de exclusão (Greenway e Munns, 1980). O acúmulo tóxico de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas folhas tem sido correlacionado ao fechamento de estômatos e a fatores não estomatais, tais como redução no conteúdo clorofílico, ambos limitando a quantidade de produção de fotoassimilatos (Romero-Aranda e Syvertsen, 1996).

O equilíbrio do potássio e do sódio intracelular é importante para a atividade de muitas enzimas citosólicas, para a manutenção do potencial de membrana e para um apropriado potencial osmótico que regula o volume celular (Zhu, 2003). Sob estresse salino, a manutenção da homeostase do  $\text{Na}^+$  e do  $\text{K}^+$  torna-se ainda mais crucial. Quando o  $\text{Na}^+$  entra nas células e acumula-se em altos níveis, torna-se tóxico para as enzimas. Para prevenir uma parada no crescimento ou morte celular, o excesso de  $\text{Na}^+$  deve ser excluído ou compartimentado nos vacúolos (Zhu, 2003).

Embora os solutos inorgânicos e orgânicos desempenhem um importante papel no crescimento das plantas superiores, sob condições de salinidade, sua contribuição relativa varia entre espécies, entre cultivares de uma mesma espécie, entre órgãos e tecidos de uma mesma planta e até entre os diferentes compartimentos de uma mesma célula (Ashraf e Harris, 2004). Dessa forma, a capacidade para acumular e compartimentalizar solutos inorgânicos, bem como sintetizar e acumular solutos orgânicos pode ser um fator adicional favorecendo o crescimento das plantas em ambientes salinos (Azevedo Neto, 2005).

### **1.2.3.2. Acumulação de íons inorgânicos**

Uma das principais respostas adaptativas das plantas à salinidade é o ajustamento osmótico. Pela definição clássica de Taiz e Zaiger (2004), o ajustamento osmótico é um processo pelo qual o potencial hídrico pode ser diminuído sem que haja decréscimo da turgescência ou do volume celular e resulta do aumento líquido no conteúdo de solutos na célula. Este fenômeno é mantido pela acumulação e perda regulada de íons inorgânicos e de solutos orgânicos de baixa massa molecular (Strange, 2004), tornando possível a manutenção da absorção de água e da pressão de turgescência da célula, o que pode contribuir para a

manutenção de processos fisiológicos, tais como: fechamento estomático, fotossíntese, alongamento e divisões celulares (Serraj e Sinclair, 2002).

Uma característica geral de muitas plantas cultivadas em ambientes salinos é a manutenção da turgescência pela acumulação de solutos inorgânicos em suas células (Flowers *et al.*, 1977). O controle de armazenamento dos íons no vacúolo permite que a planta mantenha a turgescência sem custos energéticos para síntese de solutos orgânicos, mesmo incorrendo em risco de toxidez iônica e/ou deficiência nutricional (Martinoia *et al.*, 1986; Munns e Termaat, 1986). O aumento nas concentrações de  $\text{Na}^+$  com concomitante redução nas concentrações de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , aumenta excessivamente as razões  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+/\text{Mg}^+$  (Ullah *et al.*, 1993; Azevedo Neto e Tabosa, 2000), podendo causar distúrbios na homeostase iônica.

O papel do cálcio no aumento da tolerância à salinidade está bem documentado, assim como a indução da deficiência deste íon em plantas cultivadas em substratos salinos. A aplicação do gesso é uma prática comum em solos afetados por sais (Meneses Júnior, 2002). O efeito benéfico do cálcio está de acordo com sua função na integridade de membrana e controle de seletividade na absorção e transporte de íons. Por outro lado, altas relações  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  podem inibir a absorção e o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , levando à deficiência desse elemento em solos nesse estado (Lynch e Lauchli, 1985). Zhu *et al.* (1998) sugerem que concentrações elevadas de  $\text{Na}^+$  podem deslocar o  $\text{Ca}^{2+}$  dos sítios de ligação das membranas plasmáticas intracelulares, impedindo a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células.

### **1.2.3.3. Acumulação de solutos orgânicos**

Como resposta à imposição de estresse por salinidade, diferentes espécies de plantas acumulam moléculas que são conhecidas como osmossolutos ou solutos compatíveis (Liu e Zhu, 1997). Uma alteração metabólica comum a essas plantas é o acúmulo de solutos orgânicos de baixa massa molecular. Estes solutos podem incluir ácidos orgânicos tais como oxalato e malato; compostos poliídrolícos tais como glicose, frutose, sacarose, trealose ou rafinose; poliálcoois de cadeia linear (glicerol, manitol ou sorbitol) e cíclicos (inositol, ononitol ou pinitol); alquilamidas com características anfóteras, tais como aminoácidos protéicos (arginina, glicina, serina etc.) e não-protéicos (citrulina, ornitina etc.), iminoácidos (prolina ou hidroxiprolina),



amidas e betaínas, dentre outros compostos (Zhu, 2001; Ashraf e Harris, 2004; Azevedo Neto, 2005).

De modo contrário a certos solutos, a exemplo de íons orgânicos que participam da camada de hidratação das proteínas, favorecendo seu desdobramento, os solutos compatíveis tendem a ser excluídos do raio de hidratação das proteínas, estabilizando sua estrutura (Low, 1985). Em razão desse comportamento, acredita-se que esses compostos possuam um papel importante no ajustamento osmótico de plantas submetidas ao estresse salino (Wyn Jones *et al.*, 1977). Além disso os solutos orgânicos, também ao contrário dos íons inorgânicos, mesmo em altas concentrações, não interferem no metabolismo celular normal. Por essa razão, os solutos orgânicos são também chamados de solutos compatíveis ou osmólitos compatíveis (Sairam e Tyagi, 2004).

Estudos indicam que concentrações elevadas de solutos orgânicos no citoplasma podem conferir as seguintes funções: (i) contribuição no balanço osmótico quando os eletrólitos no citoplasma estão em menor concentração do que no vacúolo (Stewart e Lee, 1974), permitindo à célula manter um potencial de turgor positivo, requerido para a expansão celular e abertura de estômatos (Nabil e Coudret, 1995) e (ii) um efeito protetor nas proteínas e estruturas celulares quando na presença de uma concentração elevada de eletrólitos no citoplasma (Pollard e Wyn, 1979). Sob condições de estresse, esses solutos podem ser acumulados em quantidades tão grandes quanto 5 a 10% da massa de matéria seca do tecido (Naidu *et al.*, 1992). Em adição, osmólitos compatíveis podem contribuir na regulação do pH citosólico e na desintoxicação do excesso de  $\text{NH}_4^+$ , e na proteção de plantas removendo ROS gerados por estresse oxidativo (Zhu, 2001).

Diversas espécies de plantas usam a prolina como soluto compatível no ajustamento osmótico (Bray, 1997). Sob condições de estresse salino, a prolina parece ser sintetizada a partir de glutamato (Larosa *et al.*, 1991). A reação é realizada em quatro passos, sendo a última catalisada pela redutase da d-pirrolina-5-ácido carboxílico (P5C). A partir de observações empíricas, foi lançada a hipótese de que a tolerância ao NaCl estaria relacionada com os níveis e a atividade de P5C (Larosa *et al.*, 1991). Além da prolina, também foi verificado o acúmulo de diversos outros solutos orgânicos em células de plantas estressadas. Como consequência, enquanto muitos trabalhos indicam uma correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a aclimação ao choque osmótico, o mesmo não é confirmado em outros

estudos (revisados em Azevedo Neto, 2005). Assim permanece a dúvida se a acumulação de prolina em tecidos de plantas é mesmo um indicador de respostas de aclimação por parte da planta.

#### **1.2.3.4. Absorção de água e crescimento continuado**

A quantidade de água transportada do solo até as folhas é proporcional ao gradiente de potencial hídrico e inversamente proporcional ao somatório das resistências apresentadas (Lacerda, 1995; Cardoso, 2000). Considerando as plantas adaptadas e ajustadas osmoticamente ao estresse salino, o gradiente de potencial pode ser mantido, associado a reduções na condutividade hidráulica das raízes e maior fechamento dos estômatos. Isso resultará em menores taxas de absorção e assimilação de CO<sub>2</sub>, induzindo menores taxas de crescimento (Azaizeh *et al.*, 1992). Em muitas ocasiões, as folhas das plantas estressadas com a salinidade, mas previamente ajustadas, apresentam aspecto normal, sendo, em geral, menores e mais tenras (maior relação massa úmida/área). Assim, nesses casos, a pressão de turgescência não é diminuída pelo estresse salino (Boyer, 1965).

No entanto, em geral, os níveis de salinidade e área foliar geralmente estão inversamente relacionados. Reduções drásticas de fixação e acumulação de CO<sub>2</sub> por unidade de área foliar, perda de turgor de células mesofílicas por meio de acumulação de sais no apoplasto ou pelo efeito tóxico dos íons podem ser evidenciadas. Por exemplo, em folhas de *Citrus* (Behboudian *et al.*, 1982) e trigo (Huang *et al.*, 1994).

#### **1.2.4. Respostas de cultivares ao estresse salino**

A salinidade traz complexidade à produção agrícola, não apenas pelos cultivos a serem conduzidos em ambientes não controlados, mas devido ao fato da conversão de biomassa vegetativa em rendimento de grão ser complexa. Um reduzido nível de salinidade pode não interferir no rendimento de grão, mesmo que a área foliar e a biomassa vegetativa sejam reduzidas. Um estudo de tolerância à salinidade de espécies cultivadas pelo *US Salinity Laboratory* (Mass e Hoffman, 1977; Usda-Ars, 2005) apresenta, para cada espécie estudada, um nível inicial de salinidade abaixo do qual não há redução na produtividade. Além disso, o estudo

traz uma correlação linear entre produtividade e aumento da salinidade (relação *bent stick*, ou “vara curvada”). Entretanto, na maioria dos casos, os dados são expressos para um único cultivar da espécie, ou um número limitado de cultivares.

Na verdade, a seleção de genótipos de uma espécie para tolerância à salinidade é problemática, pois a seleção dirigida a uma situação ambiental pode não resultar em seleção correta para um outro ambiente. Em condições de campo, um ambiente profundamente heterogêneo é encontrado, não apenas para o teor de sal no solo, mas para outros fatores como sodicidade, pH e possibilidade de elementos tóxicos (Rengasamy, 2002). Contudo, várias abordagens têm sido pesquisadas no sentido de melhorar a tolerância à salinidade, principalmente de monocotiledôneas, pela introdução de genes de tolerância em cultivares adaptadas. Inclui-se aí ampla seleção a partir de bancos internacionais de germoplasma, experimentação em campo de cultivares selecionados e métodos convencionais de melhoramento, com cruzamentos não convencionais entre parentais (Munns *et al.*, 2006). Em arroz, abordagens recentes para a pesquisa de cultivares tolerantes a sal incluem variantes somaclonais, linhas-derivadas e seleção assistida por marcador molecular (Gregorio *et al.*, 2002).

Por exemplo, Jafari-Shabestari *et al.* (1995) procederam à seleção de cerca de 400 parentais de trigo em campo irrigado e identificou muitas linhagens que foram consideradas consistentemente promissoras para rendimento de grão e tolerância ao sal. No Paquistão, a linhagem de trigo LU26S mostrou alta produtividade sob salinidade, mas foi susceptível à ferrugem e não mostrou adaptação a solos densamente sódicos (Qureshi *et al.*, 1980). Em trigo, exclusão de  $\text{Na}^+$  em folhas, associada à alta relação  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , têm sido evidenciadas como o principal mecanismo de tolerância (Ashraf e Khanum, 1997), embora não englobando todos os genótipos, mostrando que este não é o único mecanismo de tolerância a sal (El-Hendawy *et al.*, 2005).

Em casa de vegetação, uma comparação de respostas à salinidade entre espécies de cereais mostrou pequenas diferenças na produção de biomassa de diferentes cultivares de cevada, trigo e triticale (Rawson *et al.*, 1988). Aumentos significativos na tolerância ao sal geralmente vêm através da introdução de novos genes, tanto por cruzamentos com novos doadores de germoplasma, ou por transformação por um gene único. Nos dois casos, a progênie deve ser retrocruzada com cultivares adaptados. Um entendimento dos mecanismos genéticos e

fisiológicos é necessário para o programa de melhoramento, em vista de selecionar os genótipos mais promissores (Munns *et al.*, 2006). Características de tolerância à salinidade incluem exclusão de  $\text{Na}^+$ , relação favorável de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , retenção de íons, tolerância tecidual, partição de íons em folhas em diferentes estádios, ajustamento osmótico, eficiência da transpiração, vigor e floração precoces e o aumento tardio da eficiência do uso de água (EUA) (Colmer *et al.*, 2005). Uma listagem de genes individuais relacionados à regulação desses processos é apresentada em Munns (2005).

Sal na água de irrigação inibe o crescimento da planta por duas razões: 1) a presença de sal na solução do solo reduz a habilidade da planta em absorver água, levando a um crescimento mais lento. Este é o efeito osmótico ou efeito de déficit hídrico causado pela salinidade. 2) quantidades excessivas de sal introduzidas pela via de transpiração irão eventualmente injuriar células foliares, reduzindo crescimento. Este é o efeito sal-específico ou iônico da salinidade (Munns *et al.*, 2006). Para compreender a fisiologia da tolerância a altas concentrações internas de sal, foram comparados dois genótipos de trigo duro que diferem no grau de injúria foliar induzida por sal, o cultivar Wollaroi e Linha 455. Ambos cultivares foram expostos a 150mM de NaCl por 4 semanas. O desenvolvimento de copa de ambos foi substancialmente reduzido pela salinidade, porém diferenças genotípicas apareceram após 3 semanas, quando Wollaroi mostrou maior injúria foliar e maior redução de biomassa do que Linha 455. A salinidade causou uma grande queda na condutância estomática em ambos cultivares e isto não foi devido ao comprometimento das relações hídricas, pois em ambos cultivares, não foi evidenciada queda do turgor foliar. Por outro lado, fotossíntese por unidade de área, clorofilas e eficiência do PSII foi mais bem preservada no cultivar Linha 455 (James *et al.*, 2002).

Uma falta de correlação entre produção bruta e produtividade, numa comparação de 38 genótipos de trigo e outros cereais, foi evidenciada por Richards *et al.* (1987) ao concluir que o modo mais eficiente de selecionar melhores genótipos para tolerância à salinidade é testando os mesmos a baixa salinidade. Também, é sugerido que experimentos de campo não são apropriados para seleção de grande número de genótipos, especialmente germoplasma exótico, pois seus rendimentos serão influenciados fortemente pela floração e pelo tempo de maturação, tanto por outros fatores como resistência a pragas e doenças, além do

alto custo de promover homogeneidade entre os blocos em experimentos de campo (Munns *et al.*, 2006). Para obter-se aumento na tolerância ao sal, atenção tem sido dada à identificação de novas fontes genéticas para baixas taxas de absorção de  $\text{Na}^+$  até a folha. Menos atenção tem sido dada a fontes de genes de tolerância a altas concentrações de  $\text{Na}^+$  em folhas, provavelmente devido à dificuldade de quantificação das técnicas relacionadas. Fontes potenciais de tolerância a altas concentrações internas de  $\text{Na}^+$  foram identificadas em arroz (Yeo *et al.*, 1990) e trigo duro (Munns e James, 2003). Avanço na tolerância ao sal de espécies irá indubitavelmente resultar da interação próxima entre geneticistas e fisiologistas, associados à experiência de melhoristas de plantas e agricultores (Munns *et al.*, 2006).

### **1.3. HIPÓTESE**

O estresse salino provocado por cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) em concentrações elevadas afeta a germinação, crescimento e desenvolvimento plantas e sementes de feijão-caupi.

### **1.4. OBJETIVOS**

#### **1.4.1. Geral**

Determinar como o estresse salino causado por cloreto de sódio em concentrações elevadas afeta a fisiologia do feijão-caupi.

#### **1.4.2. Específicos**

- Observar como a concentração salina afeta a germinação de sementes de feijão-caupi.
- Monitorar o crescimento e o desenvolvimento de plantas de feijão-caupi submetidas ao estresse com cloreto de sódio.
- Verificar como o estresse salino afeta a concentração de cofatores metálicos em plantas de feijão-caupi.

- Monitorar como sistemas enzimáticos ligados ao estresse oxidativo são afetados, quando as plantas de feijão-caupi são tratadas com cloreto de sódio.

## 1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-NIEMI, T. S.; Campbell, W. F.; Rumbaugh, M. D. Response of alfafa cultivars to salinity during germination and post-germination growth. **Crop Science**, v.32, p.976-980, 1992.

AMZALLAG, G. N. Tolerance to salinity: new concepts for old problems. In: **Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants**. Eds: JAIWAL, P. K., SINGH, R. P., GULATI, A. Oxford Publishing. p:1-24. 1997.

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

ASHRAF, M.; KHANUM, A. Relationship between ion accumulation and growth in two spring wheat lines differing in salt tolerance at different growth stages. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.178, p.39-51, 1997.

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.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água para irrigação**. Campina Grande: UFPB, 1991. 218p.

AZAIZEH, H.; GUNSE, B.; STEUDLE, E. Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on water transport across root cell of maize (*Zea mays* L.) seedlings. **Plant Physiology**, v.99, p.886-894, 1992.

AZEVEDO NETO, A. D. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos do estresse salino em plantas de milho**. 2005. 149f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

AZEVEDO NETO, A. D.; TABOSA, J. N. Estresse salino em plântulas de milho: II. Distribuição de macronutrientes catiônicos e suas relações com o sódio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, p.165-171, 2000.

BEHBOUDIAN, M. H.; TOROKFALVY, E.; WALKER, R. R. Effect of salinity on ionic content, water relations and gas exchange parameters in some citrus scion-rootstock combinations. **Scientia Horticulturae**, v.28, p.105-116. 1986.

BINZEL, M. L.; HASEGAWA, P. M.; HANDA, A. K.; BRESSAN, R. A. Adaptation of tobacco cells to NaCl. **Plant Physiology**, v.79, p.118-125, 1985.

BORSANI, O.; VALPUESTA, V.; BOTELLA, M. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and Osmotic Stress in *Arabidopsis* seedlings. **Plant Physiology**, v.126, p.1024-1030, 2001.

BOURSIER, P.; LÄUCHLI, A. Growth responses and mineral nutrient relations of salt-stressed sorghum. **Crop Science**, v.30, p.1226-1233, 1990.

BOYER, J. S. Effects of osmotic water stress on metabolic rates of cotton plants with open stomates. **Plant Physiology**, v.40, p.229-234, 1965.

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v.2, p.48-54, 1997.

BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Plants use calcium to resolve salt stress. **Trends in Plant Science**, v.3, n.11, p.411-413, 1998.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

CAKMAK, I.; HORST, J. H. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.

CARDOSO, B. B. **Efeitos comparativos da salinidade sobre o metabolismo do nitrogênio em folhas e nódulos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] inoculado com *Bradyrhizobium* sp.** 2000. 98 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

CHAPMAN, V. J. The salinity problem in general, its importance and distribution with special reference to natural halophytes. IN: POLKAKOFF-MAYBER, A. & GALE, J. (Eds). **Plants in saline environments**. New York: Heildeberg, Berlin: Springer-Verlag, p:7-24, 1975.

CHEESEMAN, J. M. Mechanisms of salinity tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.87, p.547-550, 1988.

CHEN, C. C. S.; PLANT, A. L. Salt-induced protein synthesis in tomato roots: the role of ABA. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.334, p.677-687, 1999.

CHOUREY, K.; RAMANI, S.; APTE, S. K. Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.1165-1174, 2003.

COLMER, T. D.; MUNNS, R.; FLOWERS, T. J. Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.45, p.1425–1443, 2005.

CRAMER, G. R.; BOWMAN, D. C. Kinetics of maize leaf elongation: I. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity. **Journal of Experimental Botany**, v.42, p.1417-1426, 1991.

CROSER, C.; RENAULT, S.; FRANKLIN, J.; ZWIAZEK, J. The effect of salinity on the emergence and seedling growth of *Picea mariana*, *Picea glauca* and *Pinus banksiana*. **Environmental Pollution**, v.115, p.9-16, 2001.

CUSIDO, R. M.; PALAZON, J.; ALTABELLA, T.; MORALES, C. Effect of salinity on soluble protein, free amino acids and nicotine contents in *Nicotiana rustica* L. **Plant and Soil**, v.102, p.55-60, 1987.

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

DELL'AQUILA, A. Effect of combined salt and heat treatments on germination and heat-shock protein synthesis in lentil seeds. **Physiologia Plantarum**, v.43, n.4, p.591-594, 2000.

DELL'AQUILA, A.; SPADA, P. The effect of salinity stress upon protein synthesis of germinating wheat embryos. **Annals of Botany**, v.72, p.97-101, 1993.

DELLEDONE, M.; MURGIA, I.; EDERLE, D.; SBICEGO, P.F.; BIONDANI, A.; POLVERATI, A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease resistance response. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, n.6/8, p.605-610, 2002.

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

EL-HENDAWY, S. E.; HU, Y.; SCHMIDHALTER, U. Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p.123-134, 2005.

FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v.28, p.89-121, 1977.

FOYER, C. H.; MULLINEAUX, P. M. **Causes of Photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1994.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, v.146, p.359-388, 2000.

FREIRE-FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAUJO, J. P. P de; WATT, E. E. (eds). O caupi no Brasil, p.27-46. Brasília: IITA/EMBRAPA, p. 722, 1988.

FUNDAÇÃO IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**, 1987.



- GILBERT, G. A.; GADUSH, M. V.; WILSON, C.; MADORE, M. A. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* B. during salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.107-114, 1998.
- GORHAM, J.; WYNJONES, T. G.; McDONNELL, E. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. **Plant Soil**, v.89, p.15-40, 1985.
- GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual review of Plant Physiology**, v.30, p.149-155, 1980.
- GREGORIO, G. B.; SENADHIRA, D.; MENDOZA, R. D.; MANIGBAS, N. L.; ROXAS, J. P.; GUERTA, C. Q. Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. **Field Crops Research**, v.76, p.91-101, 2002.
- GULZAR, S.; KHAN, M. A. Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus lagopoides*. **Annals of Botany**, v.87, p.319-324, 2001.
- HAMPSON, C. R.; SIMPSON, G. M. Effects of temperature, salt, and osmotic potential on early growth of wheat (*Triticum aestivum*). I. Germination. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.524-528, 1989.
- HERNÁNDEZ, J. A.; OLMOS, E.; CORPAS F. J.; SEVILLA, F.; DEL RIO, L. A. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. **Plant Science**, v.105, p.151-167, 1995.
- HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITNIK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, n.9, p.431-438, 2001.
- HUANG, J.; REDMANN, R. E. Salt tolerance of *Hordeum* and *Brassica* species during germination and early seedling growth. **Canadian Journal of Plant Science**, v.75, p.815-819, 1995.
- HUANG, L.; MURRAY, F.; YANG, X. Interaction between mild NaCl salinity and sublethal SO<sub>2</sub> pollution on wheat *Triticum aestivum* cultivar "Wilfonyne" (Ciano/Gallo) I. Responses of stomatal conductance, photosynthesis, growth and assimilation partitioning. **Agricultural Ecosystem Environmental**, v.48, p.163-178, 1994.
- HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Effect of salt stress on germin gene expression in barley roots. **Plant Physiology**, v.110, p.971-977, 1996.
- INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.6, p.153-158, 1995.
- JAFARI-SHABESTARI, J.; CORKE, H.; QUALSET, C. O. Field evaluation of tolerance to salinity stress in Iranian hexaploid wheat landrace accessions. **Genetic Resources and Crop Evaluation**, v.42, p.147-156, 1995.
- JAMES, R. A.; RIVELLI, A. R.; MUNNS, R.; VON CAEMMERER, S. Factors affecting CO<sub>2</sub> assimilation, leaf injury and growth in salt stressed durum wheat. **Functional Plant Biology**, v.29, p.1393-1403, 2002.

JONES, M. M.; TURNER, N. C. Osmotic adjustment in expanding and fully expanded leaves of sunflower in response to water deficits. **Australian Journal of Plant Physiology**. v.7, p.181-192, 1977.

JOSHI, A. J.; MALI, B. S.; HINGLAJIA, H. Salt tolerance at germination and early growth of two forage grasses growing in marshy habitats. **Environmental and Experimental Botany**, v.54, p.267-274, 2005.

KATEMBE, W. J.; UNGAR, I. A.; MITCHELL, J. P. Effect of salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae). **Annals of Botany**, v.82, p.167-175, 1998.

KHAN, M. A.; UNGAR, I. A. The effect of salinity and temperature on the germination of polymorphic seeds and growth of *Atriplex triangularis* Willd. **American Journal of Botany**, v.71, n.4, p.481-489, 1984.

LACERDA, C. F. **Efeitos da salinidade no desenvolvimento e composição mineral do feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e utilização do  $\text{Ca}^{2+}$  como meio para minorar tais efeitos.** 1995. 87 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.

LAROSA, P. C.; RHODES, D.; RHODES, J. C.; BRESSAN, R. A.; CSONKA, L. N. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered  $\text{d}^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase. **Plant Physiology**, v.96, p.245-250, 1991.

LAUTER, D. J.; MEIRI, A.; SHUALI, M. Isoosmotic regulation of cotton and peanut at saline concentration of K and Na. **Plant Physiology**, v.87, p.911-916, 1988.

LI, W.; LIU, X.; KHAN, M. A.; Yamaguchi, S. The effect of plant growth regulators, nitric oxide, nitrate, nitrite and light on the germination of dimorphic seeds of *Suaeda salsa* under saline stress. **Journal of Plant Research**, v.118, p.207-214, 2005.

LIU, J.; ZHU, J. K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.114, p.591-596, 1997.

LOW, P. S. **Molecular basis of the biological compatibility of nature osmolytes.** In: Transport process, Iono and osmoregulation. GILLES, R.; GILLES-BAILLIEN, M. (eds). Berlin: Springer-verlag, p.469-477, 1985.

LYNCH, J.; LAUCHLI, A. Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L.). **New Phytologist**, v.99, p.345-354, 1985.

MAAS, E. V. Salinity and citriculture. **Tree Physiology**, v.12. p.195-216, 1993..

MAAS, E. V.; HOFFMAN, G. J. Crop salt tolerance – current assessment. **Journal of the Irrigation and Drainage Division of the American Society of Civil Engineering**, v.103, p.115–134, 1977.

MAFRA, R. C. Contribuição ao estudo da cultura do "feijão macassar", fisiologia, ecologia e tecnologia de produção. In: **CURSOS DE TREINAMENTO PARA PESQUISADORES DE CAUPI**, 1<sup>o</sup>, Assuntos..., Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1979.

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

MARTINOIA, E.; SCHRAMM, M. J.; KAISER, G.; KAISER, W. M.; HEBER, U. Transport of anions in isolated barley vacuoles: I. Permeability to anions and evidence for a Cl<sup>-</sup> uptake system. **Plant Physiology**, v.80, p.895-901, 1986.

MARTINS-MIRANDA, A. S. **Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] expostas à salinidade e deficiência hídrica**. 2002. 85 f, Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal Ceará, Fortaleza, 2002.

MENESES JÚNIOR, J. **Expressão de caracteres fisiológicos induzida por estresse salino em três progênies de cajueiro**. 2002. 90 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal Ceará, Fortaleza, 2002.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v.2, p.1360-1365, 2002.

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

MUNNS, R. Physiological processes limiting plant growth on saline soils: some dogmas and hypotheses. **Plant, Cell and Environment**, v.16, p.15-24, 1993.

MUNNS, R.; HUSAIN, S.; RITA, A.; RICHARD, A. R.; CONDON, T.; LINDSAY, M.; HARE, R. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. **Plant and Soil**, v. 247, p. 93-105, 2002.

MUNNS, R.; JAMES, R. A.; LAUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.5, p.1025-1043, 2006.

MUNNS, R.; JAMES, R.A. Screening methods for salt tolerance: a case study with tetraploid wheat. **Plant and Soil**, v.253, p.201–218, 2003.

MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole plant responses to salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.143-160, 1986.

MYERS, B. A.; MORGAN, W. C. Germination of salt-tolerant grass *Diplacne fusca*. II. Salinity responses. **Australian Journal of Botany**, v.37, p.239-251, 1989.

NABIL, M.; COUDRET, A. Effects of sodium chloride on growth, tissue elasticity and solute adjustment in two *Acacia nilotica* subspecies. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.217- 224, 1995.

NAIDU, B. P.; PALEG, L. G.; JONES, G. P. Nitrogenous compatible solutes in drought-stressed *Medicago* spp. **Phytochemistry**, v.31, p.1195-1197, 1992.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, n.4, p.388-395, 2002.

OLIVEIRA, J. P.; CARVALHO, A. M. A cultura do caupi nas condições de clima e de solo dos trópicos úmido e semi-árido do Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P; WATT, E. E. (eds). **O caupi no Brasil**, Brasília: IITA/EMBRAPA, p.63-69, 1988.

POLLARD, A.; WYN, J. R. G. Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. **Planta**, v.144, p.291-298, 1979.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, v.126, p.445-462, 2001.

PRIMAVESI, A. **Manejo Ecológico do Solo**, Ed. Nobel. 549p. 1987.

PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; GOMES-FILHO, E. Effects 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.; PAHLICH, E. Recent advances on the physiology of water and salt stresses. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL, 2, 1989, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba. 1989. p.24.

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

QUIN, F. M. Introduction. In: SINGH, B. B.; RAJ, M.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (eds). **Advances in cowpea research**, Nigeria: International Institute of tropical agriculture (IITA) e Japan International research center for agricultural sciences (JIRCAS). IITA, United Kingdom: Sayce Publishing, p.ix-xv, 1997.

QURESHI, R. H.; AHMAD, R.; ILYAS, M.; ASLAM, Z. Screening of wheat (*Triticum aestivum* L.) for salt tolerance. **Pakistan Journal of Agricultural Science**, v.17, p.19–26, 1980.

RAMAGOPAL, S. Differential mRNA transcription during salinity stress in barley. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.84, p.94-98, 1987.

RAMOLIYA, P. J.; PANDEY, A. N. Effect of increasing salt concentration on emergence, growth and survival of seedlings of *Salvadora oleoides* (Salvadoraceae). **Journal of Arid Environments**, v. 51, p.121-132, 2002.

RAMOLIYA, P. J.; PANDEY, A. N. Effect of salinization of soil on emergence, growth and survival of seedlings of *Cordia rothii*. **Forest Ecology and Management**, v.176, p.185-194, 2003.

RAMOLIYA, P. J.; PATEL, H. M.; PANDEY, A. N. Effect of salinization of soil on growth and macro- and micro-nutrient accumulation in seedlings of *Salvadora persica* (Salvadoraceae). **Forest Ecology and Management**, v.202, p.181-193, 2004.

RAWSON, H. M.; LONG, M. J.; MUNNS, R. Growth and development in NaCl-treated plants. 1. Leaf Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> concentrations do not determine gas exchange of leaf blades of barley. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.519-527, 1988.

REDMANN, R. E. Osmotic and specific ionic effects on the germination of alfafa. **Canadian Journal of Botany**, v.52, p.803-808, 1972.

RENGASAMY, P. Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.42, p.351-361, 2002.

RICHARDS, R. A.; DENNETT, C. W.; QUALSET, C. O.; EPSTEIN, E.; NORLYN, J. D.; WINSLOW, M. D. Variation in yield of grain and biomass in wheat, barley and triticale in a salt-affected field. **Field Crops Research**, v.15, p.277-287. 1987.

ROMERO-ARANDA, R.; SYVERTSEN, J. P. The influence of foliar-applied urea nitrogen and saline solutions on net gas exchange of citrus leaves, **Journal of American Society of Horticulture Science**, v.121, p.501-506, 1996.

ROUT, N. P.; SHAW, B. P. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. **Plant Science**. v.160, p.415-423, 2001.

SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v.86, p.407-421, 2004.

SANTOS, R. V.; MURAOKA, T. Interações salinidade e fertilidade do solo. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 26, 1997. Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: UFPB, 1997. p:289-317.

SCANDALIOS, J. G. The rise of ROS. **Trends in biochemical sciences**, v.27, n.9, p.483-486, 2002.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte regulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.333-341, 2002.

SINGH, B. B.; CHAMBLISS, O. O.; SHARMA, B. Recent advances in cowpea breeding. In: SINGH, B. B.; RAJ, M.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (eds). **Advances in cowpea research**. Nigeria: International Institute of tropical agriculture (IITA) e Japan International research center for agricultural sciences (JIRCAS). IITA, United Kingdom: Sayce Publishing, p.ix-xv, 1997.

SOARES, L. S. P. **Resistência de folhas de plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) anão-precoce aos danos oxidativos induzidos pelos estresses salino e osmótico**. 2005. 125 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

SREENIVASULU, N.; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PRAKASH, H. S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H. S.; SUDHAKAR, C. **Plant Science**, v.141, p.1-9, 1999.

STEWART, G. R.; LEE, J. A. The role of proline accumulation in halophytes. **Planta**, v.120, p.279-289, 1974.

STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Advances in Physiology Education**, v.28, p.155-159, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. ARTMED, 3th ed., 2004. 719p.

THAKUR, M.; SHARMA, A. D. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: evidence suggesting a role of proline in seed germination. **Journal of Arid Environments**, v.62, p.517-523, 2005.

TSAI, Y.-C.; HONG, C.-Y.; LIU, L.-F.; KAO, C. H. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.291-299, 2005.

TURNER, N. C. Adaptation to water deficits: a changing perspective. **Australian Journal of Plant Pathology**. v.13, p.175-190, 1986.

ULLAH, S. M.; SOJA, G.; GERZABEK, M. H. Ion uptake, osmoregulation and plant-water relations in faba beans (*Vicia faba* L.) under salt stress. **Die Bodenkultur**, v.44, p.291-301, 1993.

USDA-ARS. GEORGE E. BROWN Jr. Salinity Laboratory, Riverside, CA, USA. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908>>. Acesso em: 2005.

WAHID, A.; JAVED, I.-H.; ALI, I.; BAIG, A. RASUL, E. Short term incubation of sorghum caryopses in sodium chloride levels: changes in some pre- and post-germination physiological parameters. **Plant Science**, v.139, p.223-232, 1998.

WYN JONES, R. G.; STOREY, R.; LEIGH, R. A.; AHMAD, N.; POLLARD, A. **Hypothesis in cytoplasmic osmoregulation**. In: regulation of cell membrane activities in plants. MARRE, E.; CIFFERI, O. (eds). Elsevier, p.121-136, 1977.

YE, Y.; TAM, N. F.-Y.; LU, C.-Y.; WONG, Y.-S. Effects of salinity on germination, seedling growth and physiology of three salt-secreting mangrove species. **Aquatic Botany**, v.83, p.193-205, 2005.

YEO, A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. **Journal of Experimental Botany**. v.49, p.913-929, 1998.

YEO, A.R., YEO, M.E., FLOWERS, S.A., FLOWERS, T.J. Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance. **Theoretical and Applied Genetics**, v.79, p.377–384, 1990.

YEO, A.R.; KRAMER, A.; LIUCHLI, A.; GULLASCH, J. Ions distribution in salt stressed mature *Zea mays* roots in relation to ultrastructure and retention of sodium. **Journal of Experimental Botany**. v. 28, p.17-29, 1977.

ZAPATA, P. J.; SERRANO, M.; PRETEL, M. T. AMORÓS, A.; BOTELLA, M. A. Changes in ethylene evolution and polyamine profiles of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. **Plant Science**, v.164, p.557-563, 2003.

ZHU, B.; CHANG, M.; VERMA, D. S.; FAN, Y-L.; WU, R. Overexpression of a pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and análisis of tolerance to water and SALT stress in transgenic rice. **Plant Science**. V.139, p.41-48, 1998.

ZHU, J-K. Plant Salt Tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, n.2, p.56-71, 2001.

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

**RESPOSTA DE DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI DURANTE O  
GERMINAÇÃO DA SEMENTE E DO ESTABELECIMENTO DAS PLANTAS**



## 2.1. INTRODUÇÃO

O efeito do estresse salino sobre a germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas tem sido exaustivamente estudado tanto em espécies cultivadas (Redmann, 1972; Prisco e Vieira, 1976; Prisco *et al.*, 1981; Hampson and Simpson, 1989; Al-Niemi *et al.*, 1992; Huang and Redmann, 1995; Wahid *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2003; Misra e Dwivedi, 2004; Joshi *et al.*, 2005) quanto em espécies nativas (Khan e Ungar, 1984; Myers e Morgan, 1989; Katembe *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Gulzar e Khan, 2001; Ramoliya e Padey, 2002; Ramoliya e Padey, 2003; Ye *et al.*, 2005).

O estresse salino inibe ou retarda a germinação das sementes e o crescimento das plântulas devido a efeitos osmóticos e/ou iônicos. O primeiro distúrbio fisiológico causado pelo estresse salino é a restrição da captação de água devido à diminuição do potencial osmótico do substrato, retardando a embebição das sementes ou o alongamento da raiz (Redmann, 1972; Wahid *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Ramoliya e Padey, 2002; Ramoliya e Padey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2005). Durante o estabelecimento das plântulas, a captação de água acarreta a acumulação de íons, principalmente no eixo embrionário (Wahid *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2003).

Ao atingir concentrações tóxicas, os íons acumulados podem afetar vários processos fisiológicos e metabólicos dos tecidos embrionários, incluindo a divisão celular, a diferenciação celular, a atividade de enzimas e a captação e distribuição de nutrientes (Wahid *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Ramoliya e Padey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003; Misra e Dwivedi, 2004). Assim, a toxicidade iônica pode ocasionar o atraso da emergência das plântulas (Wahid *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Ramoliya e Padey, 2002; Ramoliya e Padey, 2003; Joshi *et al.*, 2005) e da mobilização das reservas (Wahid *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2003; Prisco e Vieira, 1976; Prisco *et al.*, 1981) ou até diminuir a viabilidade das sementes (Wahid *et al.*, 1998; Ramoliya e Padey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003) ou aumentar a mortalidade das plântulas (Croser *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2005).

Para esclarecer os mecanismos envolvidos com os efeitos do estresse salino verificados durante ou após a germinação, muitos trabalhos têm focado a interferência de tratamentos salinos sobre processos fisiológicos ou metabólicos específicos, como a mobilização de reservas (Prisco e Vieira, 1976; Prisco *et al.*,

1981; Ashraf *et al.*, 2003), expressão gênica (Ramagopal, 1987; Ramagopal, 1990; Dell'Aquila e Spada, 1993; Dell'Aquila, 2000), o metabolismo de espécies reativas de oxigênio (Sreenivasulu *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2005), a captação de nutrientes (Ashraf *et al.*, 2003; Ramoliya *et al.*, 2004), o metabolismo hormonal (Zapata *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005) e a acumulação de solutos compatíveis (Thakur e Sharma, 2005).

Em plântulas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) tratadas com NaCl, foi verificado retardo na mobilização de proteínas de reserva (Prisco e Vieira, 1976) e de amido (Prisco *et al.*, 1981) em cotilédones. Como as plântulas tratadas não apresentaram diminuição da atividade proteolítica em relação às plântulas controle, o retardo na mobilização de proteínas provavelmente foi influenciado pela translocação reduzida dos produtos de hidrólise (Prisco e Vieira, 1976). Além disso, as plântulas tratadas mostraram diminuição da atividade de amilases em comparação com as plântulas controle, bem como redução da translocação dos produtos de hidrólise (Prisco *et al.*, 1981). Assim, parece que a mobilização de reservas em cotilédones de feijão-caupi pode ser regulada por mecanismos do tipo fonte-dreno, os quais sofrem influência da salinidade causada por NaCl.

Neste trabalho, as cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi foram estudadas quanto às suas sensibilidades ou resistências ao estresse salino causado por NaCl durante a germinação e o estabelecimento de plântulas sob condições controladas e de casa de vegetação. Aspectos fisiológicos e bioquímicos foram verificados ao longo destes estádios de desenvolvimento com o intuito de constatar a expressão de sensibilidade ou resistência destas cultivares de forma mais ampla, procurando identificar possíveis mecanismos de resistência ao estresse salino.

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. Material vegetal**

Foram utilizadas as cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi. As sementes dessas cultivares foram obtidas de plantas cultivadas no campo experimental do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, CE). Após a coleta das vagens, as mesmas foram debulhadas manualmente, uniformizadas com o uso de peneiras com orifícios

redondos de 6 mm de diâmetro e mantidas em câmara fria (10°C, 45% de UR), renovando-se os estoques a cada seis meses. Algumas características das sementes são apresentadas na Tabela 1. (inserir Tabela de cultivares)

## **2.2.2. Condução dos Experimentos**

### **2.2.2.1. Germinação em condições controladas**

Para os testes de germinação em condições controladas, sementes das cultivares Pérola e Pitiúba foram desinfetadas com NaClO 0,2 % (m/v) por 30 s e 5 min, respectivamente, sob agitação eventual. Após três lavagens com água destilada deionizada, as sementes da cultivar Pérola foram embebidas por 3 min. e as da cultivar Pitiúba foram embebidas por 30 min. em água destilada deionizada. Em seguida, as sementes foram distribuídas em discos de papel germitest contido em placas de Petri com 150 mm de diâmetro. Foram utilizados seis discos de papel por placa, distribuindo-se 15 sementes de forma concêntrica entre o terceiro e o quarto disco. Os discos foram umedecidos com água destilada deionizada (controle) e NaCl 25, 50, 75 e 100 mM, em volume equivalente a duas vezes e meia o peso do papel. As sementes foram incubadas em câmara de crescimento a  $27\pm 2^\circ\text{C}$ , no escuro, por 96 h. Foram realizadas três repetições por tratamento, considerando cada placa com 15 sementes como unidade experimental. Ao final do experimento, foram realizadas determinações de porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG), massa fresca, massa seca e concentração de  $\text{Na}^+$  (em base de água de tecido) em eixos embrionários e cotilédones.

### **2.2.2.2. Germinação em condições de casa de vegetação**

Nos testes de germinação em condições de casa de vegetação, sementes das cultivares Pérola e Pitiúba foram semeadas em substrato composto por areia lavada e vermiculita em proporção 1:1 (v/v), previamente autoclavado e transferido para bandejas de isopor do tipo “plantage”. As sementes foram plantadas em profundidade uniforme de aproximadamente 2 cm e foram mantidas em condições naturais, correspondentes a temperatura média de 31°C durante o dia e 23°C durante a noite,  $1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo médio de 12 h e cerca de 55% de UR

por até oito dias. Durante os primeiros dois dias após a semeadura, os substratos foram irrigados com água destilada e, em seguida, foram iniciados os tratamentos. A umidade do tratamento controle foi mantida com água destilada e o tratamento salino foi realizado com irrigação de 100 mM NaCl até o final dos experimentos. As irrigações foram baseadas em curva de absorção e retenção de água pelo substrato, mantendo-se umidade equivalente à capacidade de campo. Foram realizadas quatro repetições por tratamento e a unidade experimental utilizada correspondia a uma bandeja contendo 36 sementes. Durante os experimentos, foi verificado o número de sementes germinadas a cada dia e, ao final dos experimentos, foram calculados porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de emergência (IVE) para cada repetição.

### **2.2.2.3. Estabelecimento de plântulas em condições ambientais controladas**

Para estudar o estabelecimento das plântulas em condições controladas, as sementes das cultivares Pérola e Pitiúba foram desinfetadas, lavadas e embebidas de acordo com os procedimentos descritos para testes de germinação (item 2.2.2.1). No entanto, essas sementes foram distribuídas em folhas de papel germitest (280 x 380 mm) umedecidas com água destilada deionizada na proporção de duas vezes e meia a massa do papel. Foram distribuídas 10 sementes em fileira, no terço superior de duas folhas sobrepostas. Uma outra folha foi utilizada para cobrir as sementes e as três folhas foram enroladas. Três rolos, contendo 10 sementes cada, foram enrolados com uma folha adicional. Este sistema foi envolvido por dois sacos plásticos desinfetados com etanol 70% (v/v), os quais foram dispostos em direções opostas e fixados com atilho (Vieira e Carvalho, 1994). As sementes foram incubadas em condições controladas ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h,  $240 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 96 h. Em seguida, as plântulas foram transferidas para folhas novas embebidas com água destilada deionizada (controle) ou NaCl 25, 50, 75 ou 100 mM, em volume equivalente a duas vezes e meia a massa do papel. As plântulas retornaram para as mesmas condições de cultivo por mais 48 h. Foram realizadas três repetições por tratamento e a unidade experimental considerada foi um rolo de papel contendo 10 plântulas. Após o período de tratamento, o material foi coletado para determinação de massa fresca, massa seca, concentração de  $\text{Na}^+$  (em base de água de tecido) em raízes, caule e folhas.

#### **2.2.2.4. Estabelecimento de plântulas em condições de casa de vegetação**

Nesse estudo foram utilizadas as plântulas obtidas nos experimentos de germinação em condições de casa de vegetação, as quais, foram coletadas ao final destes experimentos e utilizadas para determinação de massa fresca, massa seca, concentração de  $\text{Na}^+$  (em base de água de tecido) em sistema radicular e parte aérea. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento e cada unidade experimental consistia no conjunto de plântulas normais obtidas a partir de 36 sementes (unidade experimental de testes de germinação). Foram consideradas plântulas normais as que não apresentavam deformidades morfológicas (Popinigis, 1987)

#### **2.2.3. Determinações**

##### **2.2.3.1. Porcentagem de germinação**

Nos testes de germinação em condições controladas, a porcentagem de germinação (%G) foi determinada após 96 h de incubação. Foram consideradas germinadas aquelas sementes que apresentaram a protrusão da radícula. Nos testes de germinação em condições de casa de vegetação, a porcentagem de germinação foi determinada oito dias após a semeadura, considerando-se germinação a emergência da plântula. O cálculo da porcentagem de germinação foi feito de acordo com a fórmula  $\%G = (\sum n_i \cdot N^{-1}) \cdot 100$ , onde  $n_i$  corresponde ao número de sementes germinadas e N ao número total de sementes (Borghetti e Ferreira, 2004).

##### **2.2.3.2. Índice de Velocidade de Germinação e Índice de Velocidade de Emergência**

No decorrer dos testes de germinação, o número de sementes germinadas em condições controladas ou o número de plântulas emergidas em condições de casa de vegetação foi registrado a cada dia após a semeadura. A partir destes resultados, o índice de velocidade de germinação (IVG) e o índice de velocidade de emergência (IVE), respectivamente, foram calculados. Para o cálculo

destes índices, foi utilizada a fórmula IVG (IVE) =  $\sum_{i=1}^k G_i/N_i$ , onde  $G_i$  equivale ao número de sementes germinadas no dia  $i$ ;  $N_i$  ao número de dias após a semeadura, e  $k$  ao último dia de observação (Borghetti e Ferreira, 2004).

#### **2.2.3.3. Distribuição de Biomassa**

Para a determinação da massa fresca, as partes das plântulas coletadas (raízes, caule e folhas) foram pesadas em balança analítica e transferidas para sacos de papel. Este material foi secado em estufa a 70°C por 48 h e pesado novamente para a determinação da massa seca. A partir dos resultados obtidos, foram calculados umidade e razão entre parte aérea e sistema radicular, para verificar a distribuição da biomassa nas plântulas durante o período de tratamento.

#### **2.2.3.4. Curva de Embebição**

Para a determinação da curva de embebição, 10 g de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba foram desinfetadas conforme procedimentos descritos no item 2.2.2.1 e imersas em água destilada deionizada (controle) ou NaCl 100 mM por 3 e 12 h, respectivamente. Para a cultivar Pérola, as sementes foram coletadas, secadas em papel toalha e pesadas a cada 15 min, retornando imediatamente à imersão após cada pesagem. Para a cultivar Pitiúba, este procedimento foi realizado a cada 1 h.

#### **2.2.3.5. Acumulação e distribuição de Na<sup>+</sup>**

Para a determinação da concentração de Na<sup>+</sup> nos tecidos, a matéria seca obtida das diferentes partes das plântulas conforme descrito no item 2.2.2.1 foi macerada com auxílio de gral e pistilo transferidos para frascos fechados e mantidos à temperatura ambiente até as determinações. Para a extração de Na<sup>+</sup>, 50 mg de matéria seca foram extraídos com 10 mL de água destilada deionizada a 100°C por 1 h em tubos hermeticamente fechados. Após o resfriamento, as amostras foram filtradas em algodão. Para a quantificação, as amostras foram lidas em fotômetro de chama calibrado com solução padrão de NaCl contendo 50 ppm de Na<sup>+</sup>. A

concentração de  $\text{Na}^+$  foi determinada na base de conteúdo de água das diferentes partes da planta.

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. Germinação em condições ambientais controladas**

As sementes das cultivares Pérola e Pitiúba apresentaram respostas contrastantes à salinidade causada pelo NaCl durante a germinação em condições controladas (figura 1). Após 96 h de incubação, a porcentagem de germinação da cultivar Pitiúba não foi afetada pelos tratamentos salinos, mesmo nas concentrações externas de NaCl mais elevadas (figura 2). Entretanto, a porcentagem de germinação da cultivar Pérola foi menor que a da cultivar Pitiúba, mesmo no tratamento controle. Em relação ao tratamento controle, ocorreu aumento da porcentagem de germinação da cultivar Pérola em NaCl 25 mM e diminuição apenas em NaCl 100 mM.

O IVG da cultivar Pitiúba não foi afetado pelos tratamentos salinos, mesmo nas maiores concentrações externas de NaCl (tabela 1). Já a cultivar Pérola apresentou IVG inferior ao da cultivar Pitiúba no tratamento controle. Além disso, o IVG da cultivar Pérola sofreu diminuição nas maiores concentrações externas de NaCl utilizadas.

As sementes das cultivares Pérola e Pitiúba apresentaram contrastes quanto ao padrão cinético de embebição (figura 3). As sementes da cultivar Pérola mostraram embebição rápida nos primeiros 30 min, tornando-se mais lenta e gradual a partir deste momento. Até as primeiras 2 h de tratamento, não houve diferença de embebição entre as sementes tratadas e às do controle. Entretanto, as sementes tratadas apresentaram embebição discretamente mais lenta que às controle na terceira hora de tratamento. As sementes da cultivar Pitiúba apresentaram embebição lenta nas primeiras 5 h, tornando-se rápida entre 6 e 9 h. A partir deste momento, a embebição se mostrou lenta e gradual. As sementes tratadas e controle não apresentaram diferenças de embebição até a terceira hora de tratamento, mas as sementes tratadas mostraram embebição mais lenta que às do controle a partir deste momento.

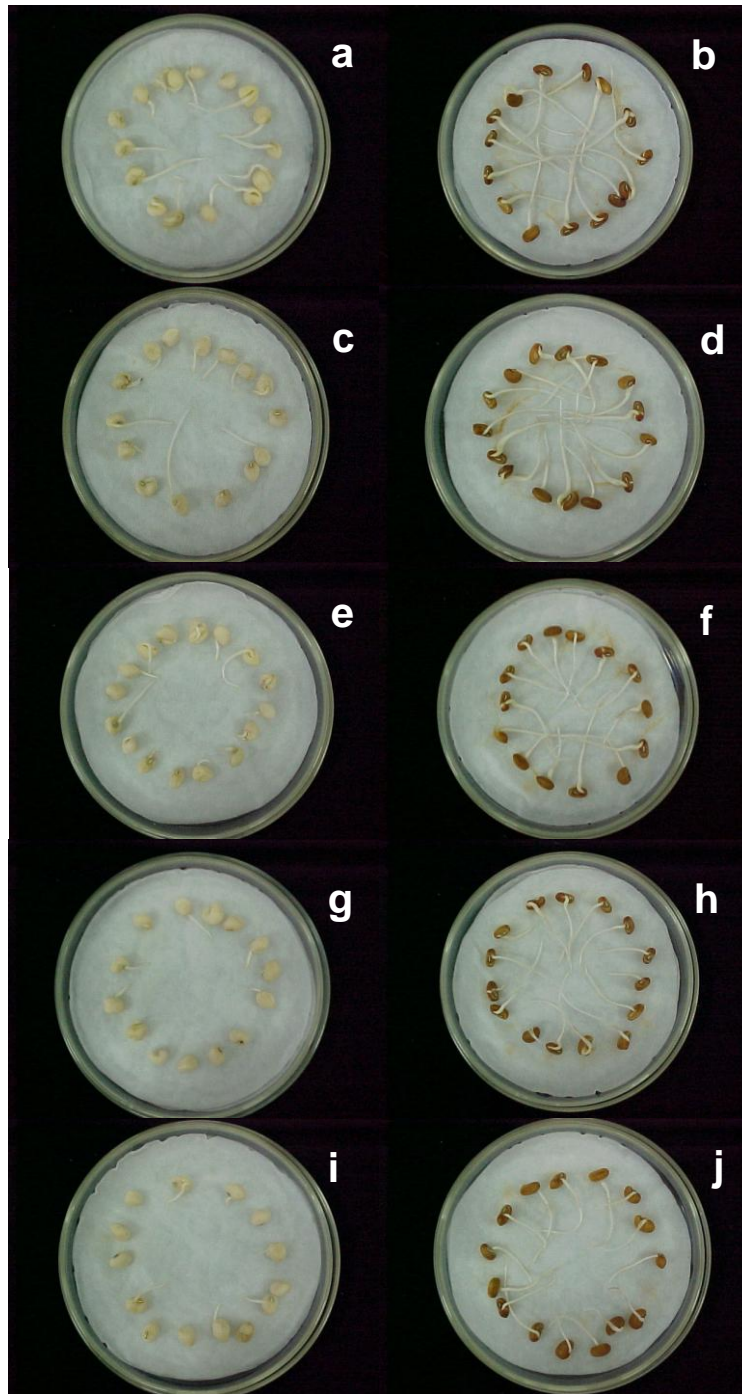


Figura 1: Aspecto morfológico de sementes das cultivares Pérola (a, c, e, g, i) e Pitiúba (b, d, f, h, j) de feijão-caupi germinadas em condições controladas. As sementes foram submetidas a tratamento com água destilada deionizada (controle; a, b) ou NaCl 25 (c, d), 50 (e, f), 75 (g, h) e 100 mM (i, j) a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , no escuro, por 96 h.



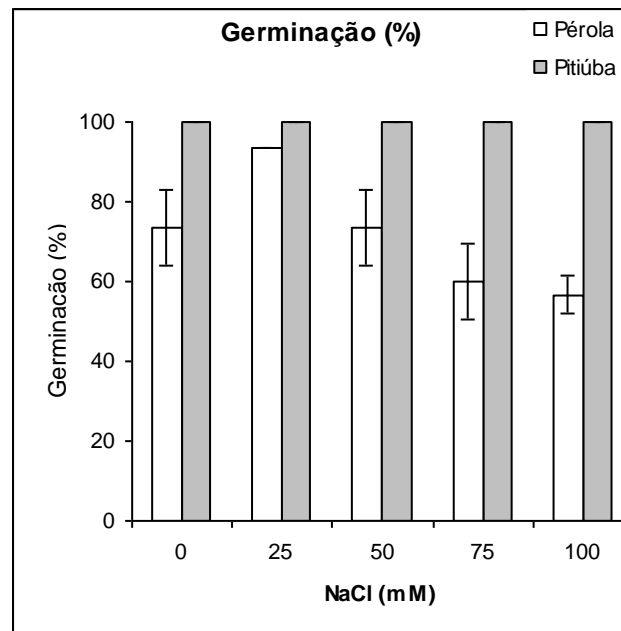


Figura 2: Porcentagem de germinação das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamentos salinos em condições ambientais controladas.

Tabela 1: Índice de velocidade de germinação das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamentos salinos em condições controladas.

Tratamentos	IVG	
	Pérola	Pitiúba
Controle	3,83	7,50
NaCl 25 mM	4,13	7,50
NaCl 50 mM	3,08	7,50
NaCl 75 mM	3,04	7,50
NaCl 100 mM	2,92	7,50

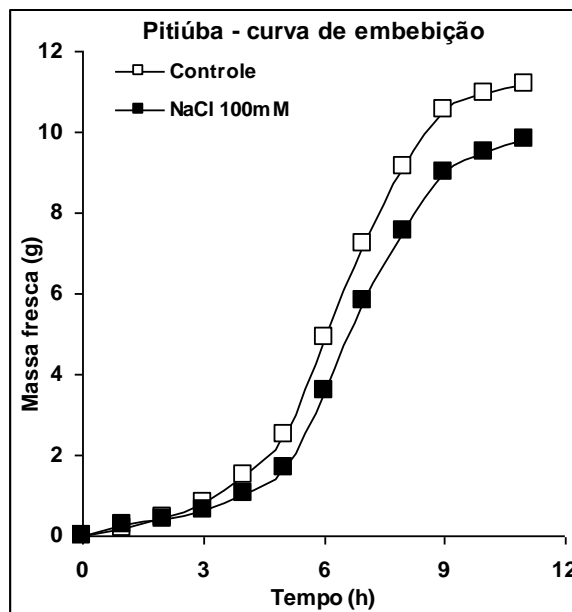
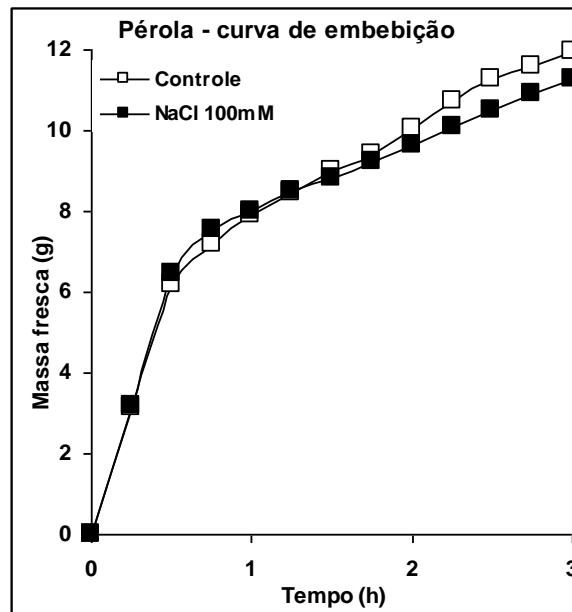


Figura 3: Curvas de embebição de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi em água destilada deionizada (controle) e NaCl 100 mM à temperatura ambiente.

Os eixos embrionários da cultivar Pérola apresentaram menor conteúdo de massa fresca que os da cultivar Pitiúba em todos os tratamentos (figura 4). Para

a cultivar Pitiúba, ocorreu diminuição do conteúdo de massa fresca dos eixos embrionários conforme o aumento da concentração externa de NaCl, mas este efeito não foi verificado para a cultivar Pérola. Adicionalmente, os cotilédones da cultivar Pérola mostraram maior conteúdo de massa fresca que os da cultivar Pitiúba em concentrações externas de NaCl iguais ou superiores a 50 mM. Para a cultivar Pitiúba, não houve mudança do conteúdo de massa fresca dos cotilédones devido aos tratamentos salinos.

Os eixos embrionários da cultivar Pérola também apresentaram menor conteúdo de massa seca que os da cultivar Pitiúba em todos os tratamentos (figura 5). Para a cultivar Pérola, foi verificada tendência de aumento do conteúdo de massa seca dos eixos embrionários em NaCl 25 e 50 mM. Porém, houve tendência de diminuição do conteúdo de massa seca dos eixos embrionários da cultivar Pitiúba segundo o aumento da concentração externa de NaCl. Além disso, os cotilédones da cultivar Pérola apresentaram maior conteúdo de massa seca que os da cultivar Pitiúba em todos os tratamentos. Os cotilédones da cultivar Pérola mantiveram maior conteúdo de massa seca em concentrações externas de NaCl mais elevadas, mas os cotilédones da cultivar Pitiúba não apresentaram alteração do conteúdo de massa seca com o tratamento salino.

Em todos os tratamentos, os eixos embrionários da cultivar Pérola apresentaram menor conteúdo de água (porcentagem de umidade) que os da cultivar Pitiúba (figura 6). Adicionalmente, o conteúdo de água dos eixos embrionários da cultivar Pitiúba não sofreu variação com o tratamento salino, enquanto os da cultivar Pérola mostraram redução no conteúdo de água em NaCl 75 e 100 mM. Não houve variação considerável do conteúdo de água dos cotilédones de ambas as cultivares conforme o aumento da concentração externa de NaCl.

Em eixos embrionários e cotilédones de ambas as cultivares, ocorreu aumento da concentração de  $\text{Na}^+$ , em base de água de tecido, de acordo com o aumento da concentração externa de NaCl (figura 7). A cultivar Pérola apresentou maior concentração de  $\text{Na}^+$  em eixos embrionários e cotilédones que a cultivar Pitiúba em todos os tratamentos. Além disso, foi verificada maior concentração de  $\text{Na}^+$  em cotilédones que em eixos embrionários.

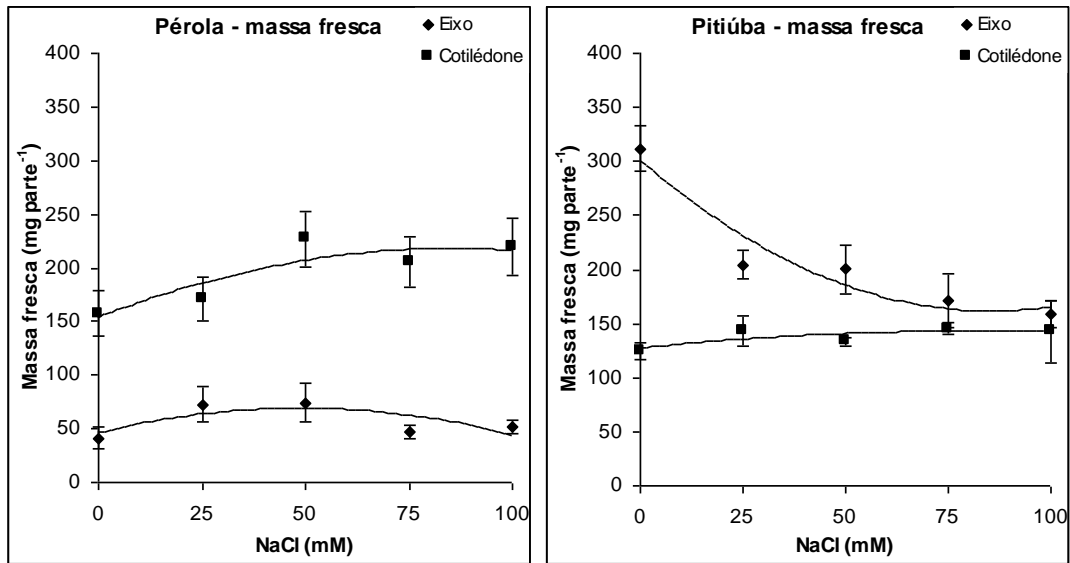


Figura 4: Conteúdo de massa fresca de eixos embrionários e cotilédones de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi germinadas sob tratamentos salinos em condições controladas.

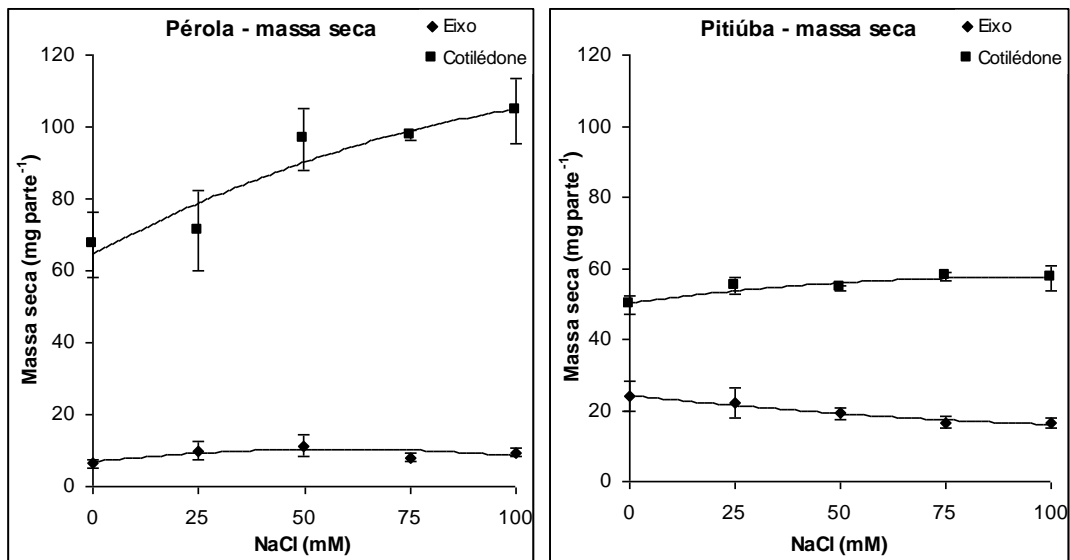


Figura 5: Conteúdo de massa seca de eixos embrionários e cotilédones de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi germinadas sob tratamentos salinos em condições controladas.

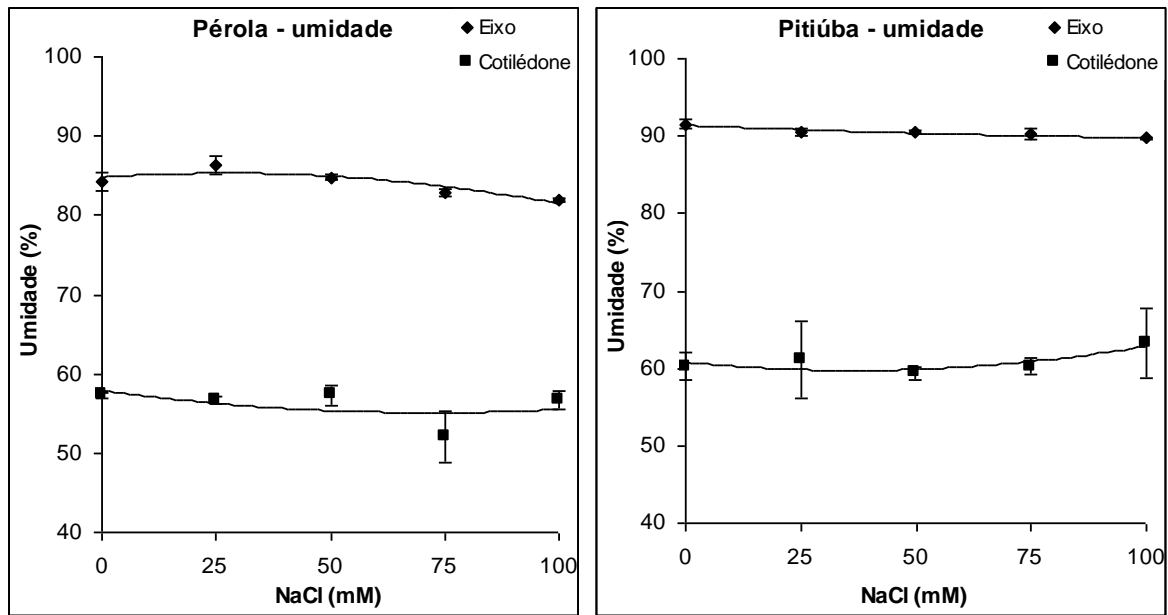


Figura 6: Conteúdo de água de eixos embrionários e cotilédones de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi germinadas sob tratamentos salinos em condições controladas.

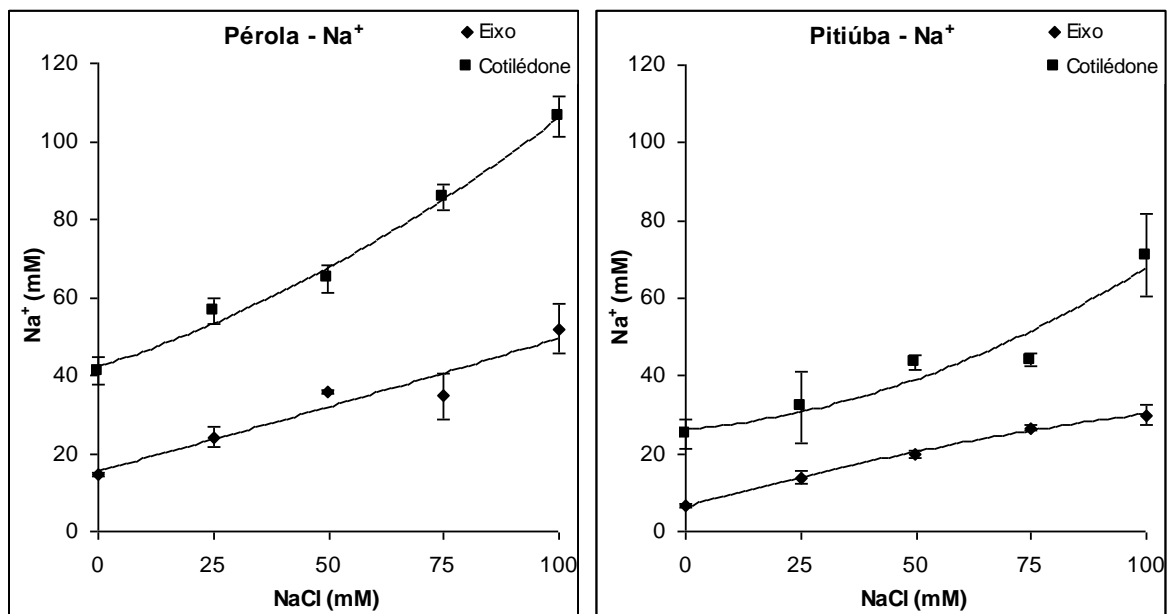


Figura 7: Concentração de Na<sup>+</sup>, em base de água de tecido, de eixos embrionários e cotilédones de sementes das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi germinadas sob tratamentos salinos em condições controladas.

### 2.3.2. Germinação em condições de casa de vegetação

As cultivares Pérola e Pitiúba apresentaram resultados contrastantes quanto à germinação em condições de casa de vegetação. Oito dias após a semeadura, a cultivar Pérola apresentou menor porcentagem de germinação que a cultivar Pitiúba, tanto no tratamento controle quanto em NaCl 100 mM (figura 8). A porcentagem de germinação da cultivar Pérola foi reduzida drasticamente em NaCl 100 mM em comparação com o respectivo tratamento controle e à cultivar Pitiúba em NaCl 100 mM. Além disso, a cultivar Pérola apresentou menor IVE que a cultivar Pitiúba, tanto no tratamento controle quanto em NaCl 100 mM (tabela 2). Houve diminuição de IVE para a cultivar Pérola em NaCl 100 mM em relação ao respectivo tratamento controle.

### **2.3.3. Estabelecimento de plântulas em condições controladas**

Após 48 h de tratamento em condições controladas, as plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba não mostraram respostas contrastantes ao tratamento salino (figura 9). Ambas as cultivares apresentaram redução de comprimento da raiz primária conforme o aumento da concentração externa de NaCl, além de diminuição do número e do comprimento de raízes secundárias.

As plântulas tratadas das cultivares Pérola e Pitiúba não mostraram diferenças marcantes quanto ao conteúdo de massa fresca em raízes, caule e folhas em relação às respectivas plântulas controle (figura 10). Apesar disso, as plântulas da cultivar Pérola apresentaram maior conteúdo de massa fresca em todas as partes, quando comparadas às plântulas da cultivar Pitiúba.

As plântulas tratadas de ambas as cultivares também não apresentaram diferenças do conteúdo de massa seca em raízes e folhas em comparação com as respectivas plântulas controle, mas apresentaram maior conteúdo de massa seca em caule, sobretudo nas maiores concentrações externas de NaCl (figura 11). Novamente, as plântulas da cultivar Pérola mostraram maior conteúdo de massa seca em raízes, caule e folhas que as plântulas da cultivar Pitiúba.

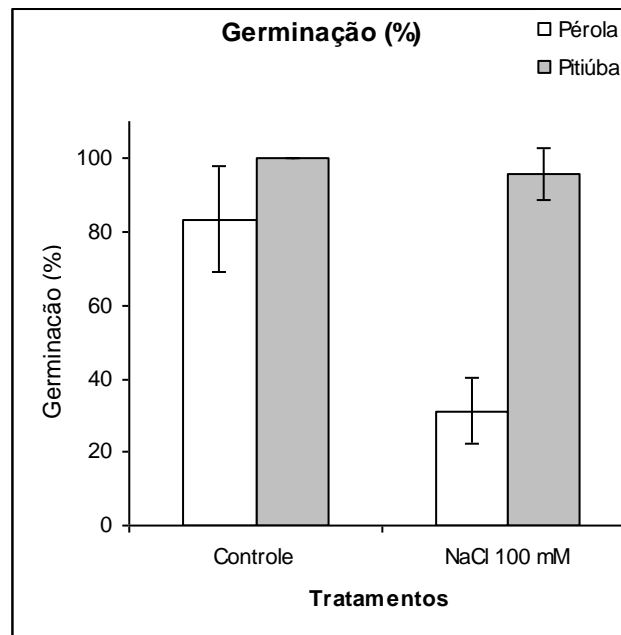


Figura 8: Porcentagem de germinação das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamento salino em condições de casa de vegetação. As sementes foram submetidas a tratamento com água destilada deionizada (controle) ou NaCl 100 mM a partir do segundo dia após a semeadura e permaneceram sob temperatura média de 31°C durante o dia e 23°C durante a noite, cerca de 55% de UR, fotoperíodo médio de 12 h e 1400  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  por oito dias.

Tabela 2: Índice de velocidade de emergência das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamento salino em condições de casa de vegetação.

Tratamento	IVG	
	Pérola	Pitiúba
Controle	9,8	11,8
NaCl 100 mM	8,4	11,3

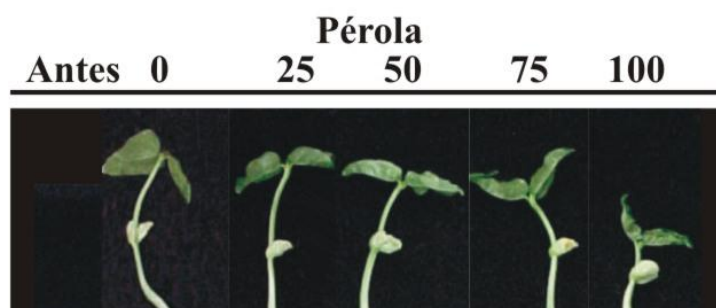


Figura 9: Aspecto morfológico de plântulas das cultivares Pérola (acima) e Pitiúba (abaixo) de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas. Quatro dias após a semeadura, as plântulas foram submetidas a tratamento com água destilada deionizada (controle) ou NaCl 25, 50, 75 e 100 mM (da esquerda para a direita) a  $27\pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 12 h e  $240\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  por 48 h.

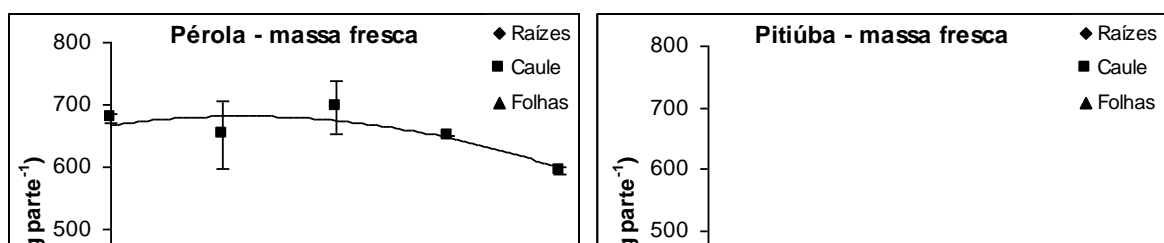




Figura 10: Conteúdo de massa fresca de raízes, caule e folhas de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas.

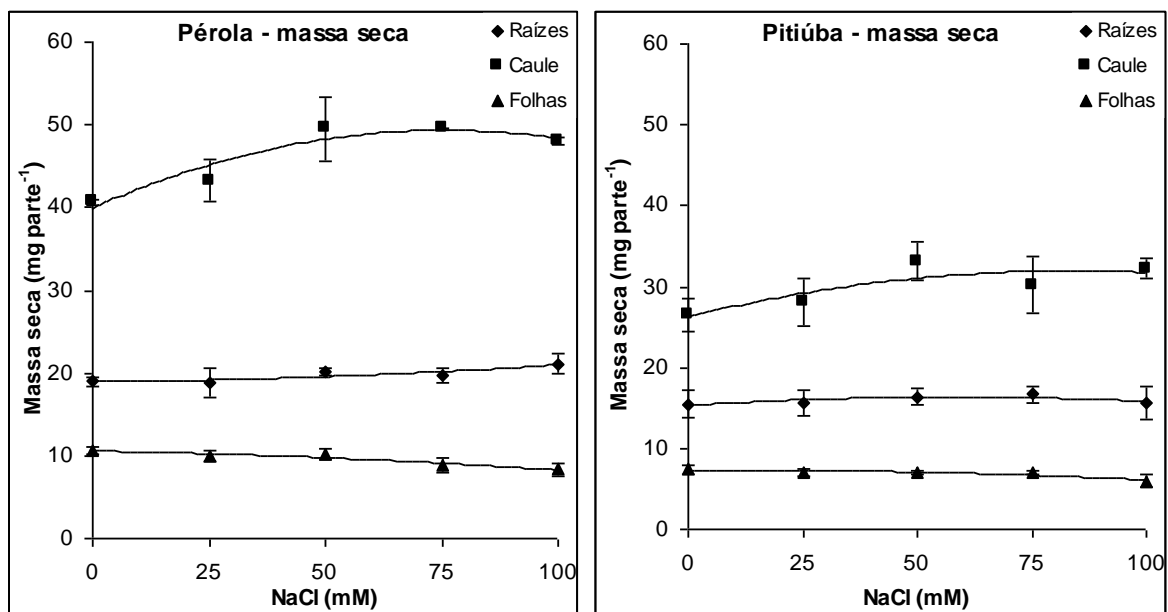


Figura 11: Conteúdo de massa seca de raízes, caule e folhas de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas.

As plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba mostraram pouca diferença quanto ao acúmulo de massa seca em sistema radicular, mas as plântulas da cultivar Pérola apresentaram maior acúmulo de massa seca em parte aérea em comparação com as da cultivar Pitiúba (figura 11). As concentrações externas de

NaCl utilizadas não induziram modificações consideráveis na razão entre parte aérea e sistema radicular em ambas as cultivares (tabela 3).

Em raízes, caule e folhas das plântulas tratadas das duas cultivares houve pequena diminuição do conteúdo de água (porcentagem de umidade) em relação às plântulas controle, a qual foi um pouco mais acentuada nas concentrações externas de NaCl mais elevadas (figura 12).

As raízes e o caule das plântulas tratadas de ambas as cultivares apresentaram aumento acentuado da concentração de  $\text{Na}^+$  (em base de água de tecido) de acordo com o aumento da concentração externa de NaCl (figura 13). Adicionalmente, as raízes acumularam cerca de três vezes mais  $\text{Na}^+$  que o caule em todos os tratamentos e as raízes da cultivar Pitiúba acumularam mais  $\text{Na}^+$  que as da cultivar Pérola. Entretanto, as folhas das plântulas tratadas das duas cultivares não mostraram variações consideráveis na concentração de  $\text{Na}^+$ , mesmo nas maiores concentrações externas de NaCl.

Tabela 3: Razão entre parte aérea e sistema radicular de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamento salino em condições controladas.

Tratamento	Razão parte aérea/sistema radicular	
	Pérola	Pitiúba
Controle	2,70	2,20
NaCl 25 mM	2,87	2,25
NaCl 50 mM	2,97	2,46
NaCl 75 mM	2,78	2,23
NaCl 100 mM	2,68	2,28

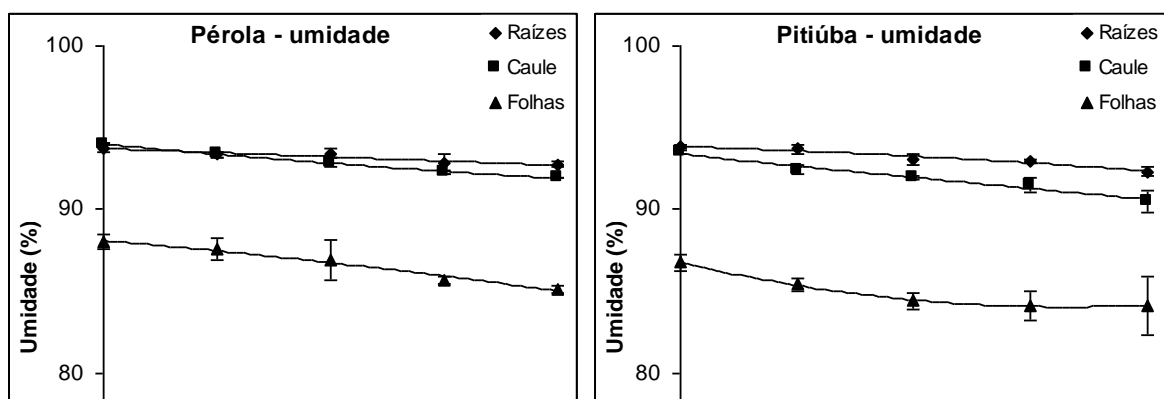


Figura 12: Conteúdo de água de raízes, caule e folhas de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas.

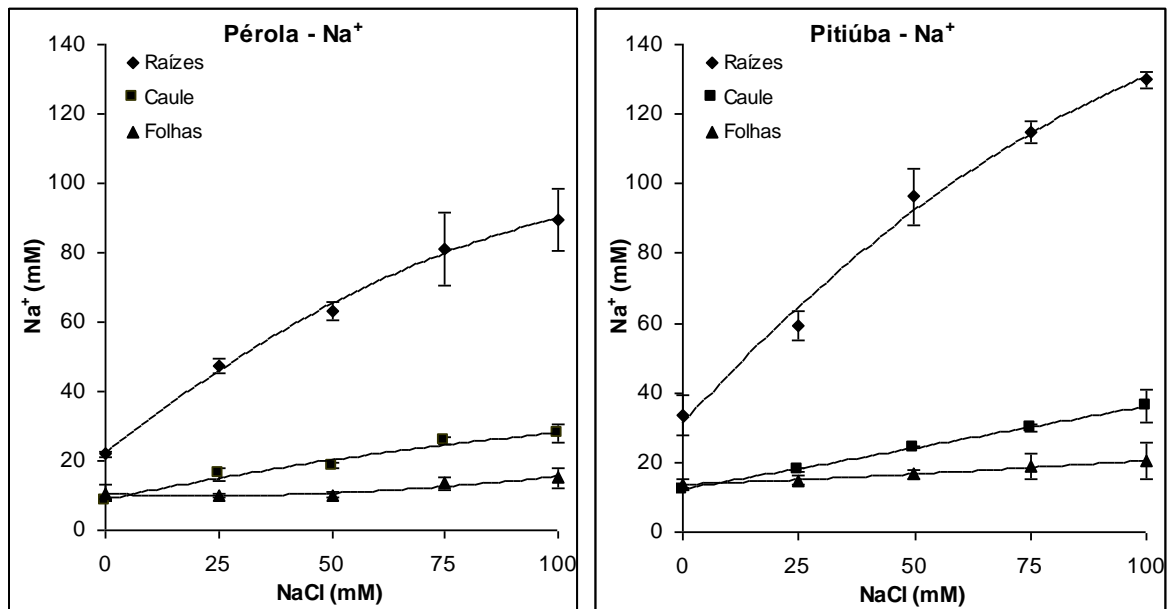


Figura 13: Concentração de  $\text{Na}^+$  em raízes, caule e folhas de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamentos salinos em condições controladas.

#### 2.3.4. Estabelecimento de plântulas em condições de casa de vegetação

Em condições de casa de vegetação, as plântulas da cultivar Pérola apresentaram menor conteúdo de massa fresca em raízes e parte aérea que as da cultivar Pitiúba em ambos os tratamentos (figura 14). No entanto, as plântulas

tratadas apresentaram menor conteúdo de massa fresca que as controle das duas cultivares.

O conteúdo de massa seca em raízes e parte aérea das plântulas da cultivar Pérola também foi menor que o das plântulas da cultivar Pitiúba nos dois tratamentos (figura 15). Porém, foi verificado menor conteúdo de massa seca em raízes e parte aérea de plântulas tratadas apenas para a cultivar Pitiúba. As plântulas tratadas e controle da cultivar Pérola não apresentaram diferenças quanto ao conteúdo de massa seca em raízes e parte aérea.

As plântulas tratadas, de ambas as cultivares, mostraram diminuição sutil na razão entre parte aérea e sistema radicular em comparação com as plântulas controle (tabela 4). A diminuição desta razão ocorreu devido à redução no acúmulo de massa seca em parte aérea de plântulas tratadas, especialmente da cultivar Pitiúba.

Nas raízes, de ambas as cultivares, não houve diminuição do conteúdo de água (porcentagem de umidade) devido ao tratamento com NaCl (figura 16). Além disso, não existem diferenças de conteúdo de água nas raízes das duas cultivares, nos dois tratamentos. No entanto, ocorreu diminuição do conteúdo de água na parte aérea das plântulas tratadas da cultivar Pérola, em relação às plântulas controle. Assim, o tratamento com NaCl propiciou maior prejuízo no acúmulo de massa seca que no acúmulo de água em plântulas de ambas as cultivares.

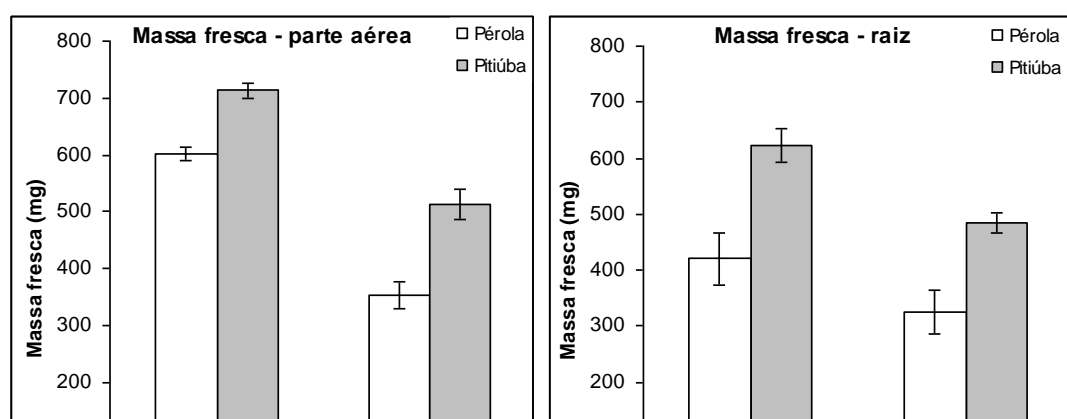


Figura 14: Conteúdo de massa fresca em raízes e parte aérea de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamento salino em condições de casa de vegetação. As sementes foram submetidas a tratamento com água destilada deionizada (controle) ou NaCl 100 mM a partir do segundo dia após a semeadura e permaneceram sob temperatura média de 31°C durante o dia e 23°C durante a noite, aproximadamente 55% de UR, fotoperíodo médio de 12 h e 1400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por oito dias.

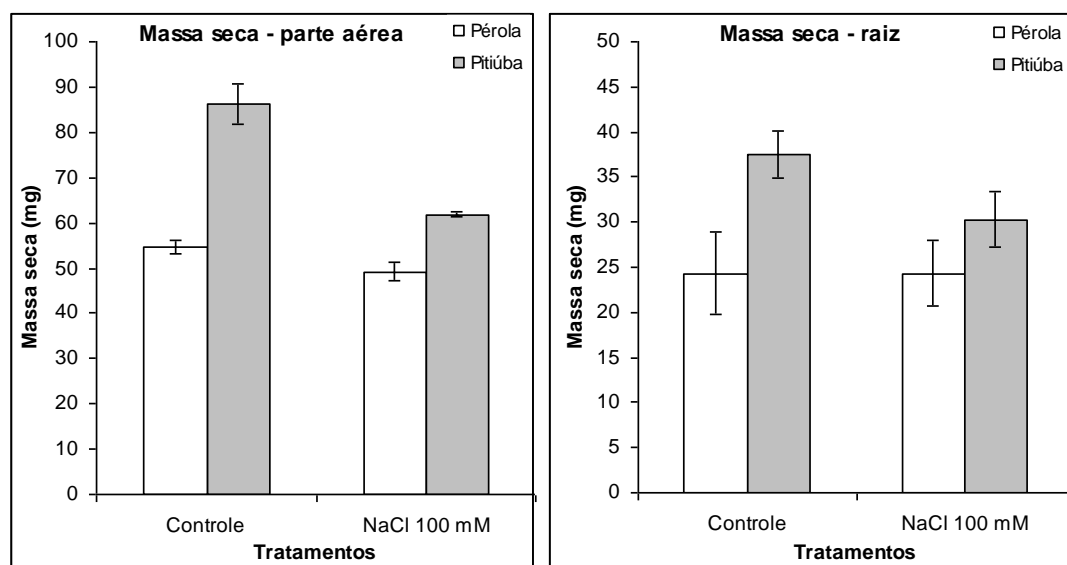


Figura 15: Conteúdo de massa seca em raízes e parte aérea de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamento salino em condições de casa de vegetação.

Tabela 4: Razão entre parte aérea e sistema radicular das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi sob tratamento salino em condições de casa de vegetação.

Tratamento	Razão parte aérea/sistema radicular	
	Pérola	Pitiúba
Controle	2,21	2,26
NaCl 100 mM	2,05	2,07

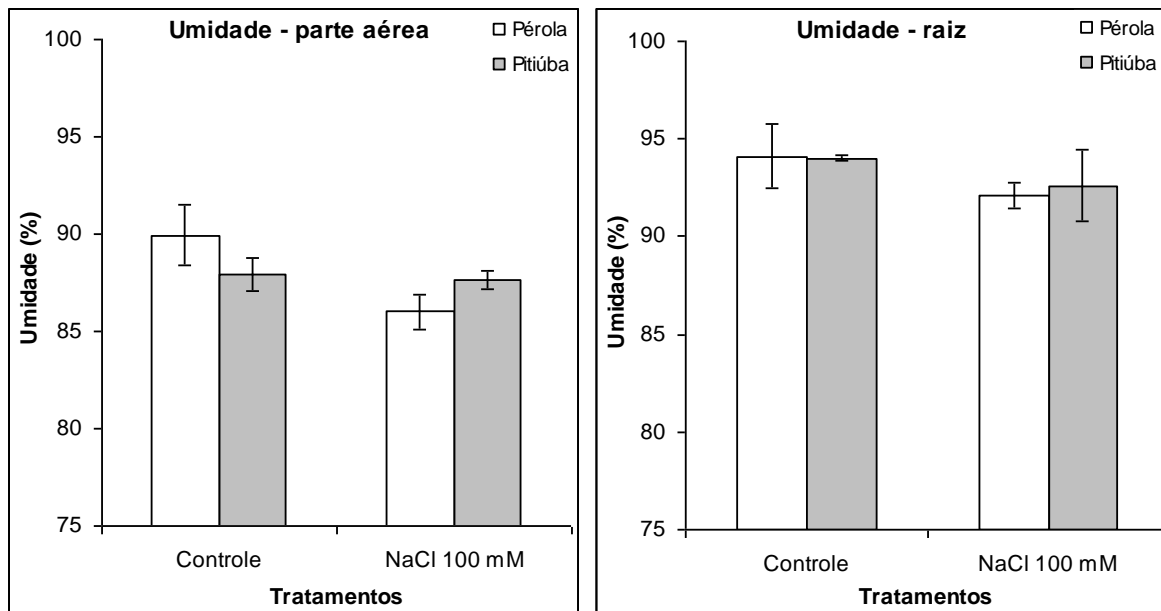


Figura 16: Conteúdo de água (porcentagem de umidade) em raízes e parte aérea de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi submetidas a tratamento salino em condições de casa de vegetação.

## 2.4. DISCUSSÃO

### 2.4.1. Germinação

De acordo com os resultados obtidos, a cultivar Pérola de feijão-caupi apresentou maior sensibilidade à salinidade causada por NaCl durante a

germinação, enquanto a cultivar Pitiúba mostrou maior resistência, tanto em condições controladas quanto em casa de vegetação. Em condições controladas, a cultivar Pérola apresentou menor porcentagem de germinação (figura 1) e menor IVG (tabela 2) nas concentrações externas de NaCl mais elevadas, indicando que os tratamentos inibiram e atrasaram a germinação das sementes desta cultivar. Já a cultivar Pitiúba sob tratamentos salinos não apresentou mudanças na porcentagem de germinação e no IVG em comparação com o respectivo controle, mostrando que as sementes desta cultivar não sofreram inibição nem atraso da germinação devido à salinidade causada pelo NaCl. Outros autores já haviam descrito a redução da porcentagem de germinação (Redmann, 1974; Al-Niemi *et al.*, 1992; Misra e Dwivedi, 2004) e da velocidade de germinação (Ramoliya e Pandey, 2002; Ramoliya e Pandey, 2003; Misra e Dwivedi, 2004) causada pelo estresse salino. Adicionalmente, outras leguminosas cultivadas, como alfafa (Redmann, 1974; Al-Niemi *et al.*, 1992) e *Phaseolus aureus* (Misra e Dwivedi, 2004), também apresentam cultivares que respondem diferencialmente ao estresse salino durante a germinação.

Em casa de vegetação, a cultivar Pérola também mostrou menor porcentagem de germinação (figura 8) e menor IVE (tabela 2) em NaCl 100 mM que em tratamento controle, evidenciando novamente inibição e atraso da germinação causado pelo tratamento salino. No entanto, a cultivar Pitiúba não sofreu alterações na porcentagem de germinação, nem no IVE devido ao tratamento salino. Em casa de vegetação, a cultivar Pérola apresentou menor porcentagem de germinação em NaCl 100 mM (figura 8), que em condições controladas (figura 2). Como as condições de casa de vegetação são mais aproximadas das condições naturais de cultivo, evidencia-se que o desempenho desta cultivar durante a germinação poderá ser inferior ao da cultivar Pitiúba em condições de campo, especialmente em solos salinizados.

O padrão cinético de embebição pode consistir em um fator importante para a sensibilidade ou a resistência das cultivares Pérola e Pitiúba ao estresse salino durante a germinação. As sementes da cultivar Pérola apresentaram embebição mais rápida que as sementes da cultivar Pitiúba, especialmente durante a primeira hora de incubação (figura 3). É provável que a velocidade de embebição esteja relacionada com a diferença de estrutura do tegumento das sementes das cultivares. As sementes da cultivar Pérola apresentam tegumento mais delgado e aparentemente mais permeável que as sementes da cultivar Pitiúba. A embebição

rápida pode ocasionar a ruptura das membranas celulares, pelo dismantelamento das bicamadas lipídicas durante a reidratação do protoplasma, envolvendo a transição entre os estados de gel (mais rígido, antes da embebição) e de cristal líquido (mais fluido, após a embebição) das membranas. A ruptura das membranas acarreta o extravasamento dos conteúdos celulares e a morte das células, podendo inviabilizar as sementes (Bewley e Black, 1994). Além disso, as sementes tratadas e controle da cultivar Pérola não apresentaram diferenças na captação de água durante este período. Assim, é possível que as sementes tratadas também tenham captado e acumulado  $\text{Na}^+$ , acarretando possíveis distúrbios metabólicos durante a germinação, devido à toxicidade deste íon (Wahid *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001). A partir da segunda hora de embebição, para a cultivar Pérola, e da quarta hora, para a cultivar Pitiúba (figura 3), foi verificada menor captação de água pelas sementes tratadas que pelas sementes controle. Esta restrição da captação de água pode estar relacionada ao efeito osmótico do tratamento salino para a cultivar Pitiúba, uma vez que as sementes desta cultivar sofreram hidratação rápida a partir da quarta hora de embebição. No entanto, as sementes da cultivar Pérola já se apresentavam quase totalmente hidratadas após duas horas de embebição, de modo que a restrição da captação de água nas sementes tratadas pode ser decorrente de distúrbios metabólicos causados durante a reativação do metabolismo (Castro e Hilhorst, 2004).

Durante a germinação em condições controladas, os eixos embrionários da cultivar Pérola apresentaram menor conteúdo de massa fresca (figura 4) e massa seca (figura 5) que os da cultivar Pitiúba em todos os tratamentos. Entretanto, os eixos embrionários da cultivar Pérola não sofreram alterações no conteúdo de massa fresca devido aos tratamentos salinos, enquanto os eixos embrionários da cultivar Pitiúba apresentaram redução do conteúdo de massa fresca conforme o aumento da concentração externa de NaCl. Além disso, os eixos embrionários de ambas as cultivares não apresentaram modificações do conteúdo de massa seca devido aos tratamentos salinos (figura 5). Deste modo, é provável os eixos embrionários da cultivar Pitiúba sofreram diminuição do conteúdo de massa fresca por captarem menos água do substrato devido ao efeito osmótico do tratamento salino. Em eixos embrionários e cotilédones de girassol, o menor incremento do conteúdo de massa fresca durante a germinação, segundo o aumento da



concentração externa de NaCl, também evidenciou o efeito osmótico do tratamento salino (Ashraf *et al.*, 2003).

Em contraponto, os cotilédones da cultivar Pérola mostraram maior conteúdo de massa fresca (figura 4) e massa seca (figura 5) que os da cultivar Pitiúba em todos os tratamentos. Adicionalmente, os cotilédones da cultivar Pérola mantiveram mais massa seca de acordo com o aumento da concentração externa de NaCl, enquanto os da cultivar Pitiúba não sofreram alterações do conteúdo de massa seca devido aos tratamentos salinos (figura 5). Assim, possivelmente os tratamentos salinos causaram atraso da mobilização de reservas nos cotilédones da cultivar Pérola. Este efeito do estresse salino sobre a mobilização de reservas já havia sido descrito para feijão-caupi por outros autores (Prisco e Vieira, 1976; Prisco *et al.*, 1981).

Tanto os cotilédones quanto os eixos embrionários da cultivar Pérola acumularam mais Na<sup>+</sup> que os da cultivar Pitiúba conforme o aumento da concentração externa de NaCl (figura 7). Além disso, os cotilédones de ambas as cultivares acumularam mais Na<sup>+</sup> que os respectivos eixos embrionários. O acúmulo de Na<sup>+</sup> nos tecidos pode desencadear efeitos tóxicos deste íon, principalmente sobre a atividade de transportadores de K<sup>+</sup> e de enzimas dependentes de K<sup>+</sup> como co-fator, resultando em danos nutricionais e metabólicos (Maathuis e Amtmann, 1999; Blumwald *et al.*, 2000; Serrano e Rodriguez-Navarro, 2001). Concentrações intracelulares de Na<sup>+</sup> em torno de 100 mM podem ser suficientemente altas para causar efeitos tóxicos devido à competição entre Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> por sítios de ligação em transportadores ou enzimas (Maathuis e Amtmann, 1999). Assim sendo, os cotilédones da cultivar Pérola, que acumularam Na<sup>+</sup> em concentração superior a 100 mM, em base de água de tecido, podem ter sofrido efeitos tóxicos do NaCl, acarretando o retardo da mobilização de reservas.

De acordo com as evidências constatadas, as cultivares Pérola e Pitiúba apresentaram respostas diferenciais à salinidade causada pelo NaCl durante a germinação. A sensibilidade da cultivar Pérola durante esta fase do desenvolvimento provavelmente está relacionada à alta permeabilidade do tegumento, que permite embebição mais rápida (figura 3) e maior acúmulo de Na<sup>+</sup> (figura 7). Deste modo, os tecidos desta cultivar estariam mais propensos a sofrer danos de membrana e distúrbios metabólicos que os da cultivar Pitiúba. Além disso, os resultados evidenciam que o desenvolvimento do eixo embrionário possivelmente foi afetado

pelo retardo na mobilização de reservas em cotilédones da cultivar Pérola (figura 5) ou por efeito osmótico direto na cultivar Pitiúba (figura 4).

#### 2.4.2. Estabelecimento das plântulas

As cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi não apresentaram respostas contrastantes ao estresse salino durante o estabelecimento das plântulas em condições controladas. Ambas as cultivares mostraram redução de crescimento do sistema radicular, incluindo a diminuição do comprimento da raiz primária conforme o aumento da concentração externa de NaCl, além de diminuição do número e do comprimento de raízes secundárias. Outras espécies, como *Pinus banksiana*, *Picea mariana*, *Picea glauca* (Croser *et al.*, 2001), *Salvadora oleiodes* (Ramoliya e Pandey, 2002), *Cordia rothii* (Ramoliya e Pandey, 2003) e *Phaseolus aureus* (Misra e Dwivedi, 2004), também apresentaram redução do comprimento das raízes como resposta ao estresse salino.

Apesar disso, os tratamentos salinos não provocaram modificações proeminentes do conteúdo de massa fresca (figura 10), massa seca (figura 11) e água (figura 12) nas cultivares Pérola e Pitiúba durante o período de incubação. A cultivar Pérola apresentou maior conteúdo de massa fresca e massa seca em raízes, caule e folhas que a cultivar Pitiúba, em todos os tratamentos. A diferença verificada no tamanho das plântulas entre as cultivares pode ser decorrente da diferença no tamanho das suas sementes. A cultivar Pérola possui sementes maiores que as da cultivar Pitiúba, possivelmente contendo maior quantidade de reservas. Assim, a mobilização e a distribuição destas reservas durante o crescimento das plântulas poderiam acarretar a diferença de tamanho observada.

Adicionalmente, as plântulas da cultivar Pérola apresentaram maior razão entre parte aérea e sistema radicular que as plântulas da cultivar Pitiúba (Tabela 3), devido ao maior acúmulo de massa seca na parte aérea. Novamente, a maior disponibilidade de reservas em sementes da cultivar Pérola pode ter possibilitado a translocação mais intensa de produtos de hidrólise para a parte aérea.

Plântulas de outras espécies, incluindo *Salvadora oleiodes* (Ramoliya e Pandey, 2002), *Cordia rothii* (Ramoliya e Pandey, 2003) e *Phaseolus aureus* (Misra e Dwivedi, 2004), apresentaram redução do conteúdo de massa fresca e massa seca tanto em raízes quanto em parte aérea de acordo com o aumento da

concentração externa de sais. No entanto, as plântulas destas espécies foram expostas aos tratamentos salinos durante períodos mais prolongados, variando de 5 a 14 dias, enquanto as plântulas de feijão-caupi foram expostas por apenas 48 h. Deste modo, talvez o efeito dos tratamentos salinos sobre os conteúdos de massa fresca e massa seca não tenham sido verificados em plântulas de feijão-caupi devido ao tempo de exposição relativamente curto.

Assim como o conteúdo de massa fresca e massa seca, o conteúdo de água de raízes, caule e folhas das plântulas de feijão-caupi não sofreu alterações substanciais devido aos tratamentos salinos (figura 12). Houve apenas tendência discreta de diminuição do conteúdo de água conforme o aumento da concentração externa de NaCl. Portanto, parece que os efeitos osmóticos decorrentes dos tratamentos salinos foram pouco pronunciados sobre o conteúdo de água das plântulas ao final do tempo de exposição.

No entanto, é possível que os tratamentos salinos tenham induzido efeitos iônicos sobre as plântulas de ambas as cultivares ao final dos experimentos. Houve aumento drástico da concentração de Na<sup>+</sup>, em base de água de tecido, em caule e principalmente em raízes de acordo com o aumento da concentração externa de NaCl, mas não houve aumento da concentração de Na<sup>+</sup> em folhas (figura 13). Além disso, as raízes foram capazes de concentrar em torno de três vezes mais Na<sup>+</sup> que o caule em todos os tratamentos salinos. Estes resultados evidenciam a existência de mecanismos fisiológicos que acarretam a concentração de Na<sup>+</sup> em raízes e impedem a sua distribuição para a parte aérea, evitando os seus efeitos tóxicos sobre o metabolismo.

Possíveis mecanismos de exclusão de Na<sup>+</sup> das folhas foram relatados para outras espécies expostas ao estresse salino. Em dicotiledôneas, parece que as raízes atuam na retenção ou na exclusão de Na<sup>+</sup>. Por exemplo, plantas de soja expostas à salinidade induzida por NaCl também concentram Na<sup>+</sup> em raízes (Durand e Lacan, 1994) e uma cultivar resistente de *Phaseolus aureus* impede a acumulação de Na<sup>+</sup> tanto em raízes quanto em parte aérea sob tratamentos salinos (Misra e Dwivedi, 2004). Em monocotiledôneas, o caule ou a bainha das folhas pode desempenhar algum papel na retenção de Na<sup>+</sup>. Em sorgo, sementes tratadas com NaCl geram plântulas que acumulam Na<sup>+</sup> no mesocótilo (Wahid *et al.*, 1998). Já em trigo, plântulas sob tratamentos salinos impedem a acumulação de Na<sup>+</sup> no limbo devido à retenção deste íon na bainha das folhas (Davenport *et al.*, 2005). Neste

contexto, feijão-caupi se mostra um bom modelo de estudo para esclarecer mecanismos fisiológicos relacionados à homeostase iônica sob estresse salino, devido à sua capacidade de exclusão de  $\text{Na}^+$  das folhas e retenção de  $\text{Na}^+$  em raízes.

Transportadores de  $\text{Na}^+$  localizados em membrana plasmática e tonoplasto foram caracterizados em algumas espécies e foram relacionados com mecanismos de exclusão e compartimentalização de  $\text{Na}^+$ . O contra-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1 de *Arabidopsis thaliana*, é expresso em membrana plasmática de células parenquimáticas do xilema e deve atuar na exclusão de  $\text{Na}^+$  durante o carregamento dos elementos de vaso em raízes, impedindo a sua translocação para a parte aérea (Shi *et al.*, 2002). Em células expandidas, o contra-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHX1 é expresso em tonoplasto e deve agir na compartimentalização de  $\text{Na}^+$  no vacúolo (Graxiola *et al.*, 1999). A identificação e a caracterização destes transportadores em plântulas de feijão-caupi pode esclarecer os mecanismos utilizados por esta espécie para concentrar  $\text{Na}^+$  em raízes.

Em condições de casa de vegetação, as plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba apresentaram respostas mais contrastantes ao tratamento salino. As plântulas tratadas de ambas as cultivares mostraram redução de massa fresca em raízes e parte aérea em relação às respectivas plântulas controle (figura 14). No entanto, as plântulas da cultivar Pérola apresentaram menor conteúdo de massa fresca que as plântulas da cultivar Pitiúba nos dois tratamentos. De acordo com os resultados referentes ao conteúdo de massa seca (figura 15) e água (figura 16), as plântulas da cultivar Pérola não sofreram redução pronunciada de massa seca devido ao tratamento salino, mas sofreram redução do conteúdo de água, especialmente em parte aérea. Assim sendo, as diferenças observadas de massa fresca entre as plântulas tratadas e controle desta cultivar se devem à redução do conteúdo de água em resposta ao tratamento salino. Neste sentido, parece que o tratamento salino inibiu o crescimento das plântulas da cultivar Pérola devido ao efeito osmótico deste tratamento. Para as plântulas da cultivar Pitiúba, os resultados foram inversos. As plântulas tratadas desta cultivar apresentaram redução do conteúdo de massa seca em relação às plântulas controle, mas praticamente não apresentaram diferenças em relação ao conteúdo de água. Deste modo, é possível que o tratamento salino tenha agido sobre as plântulas da cultivar Pitiúba de forma

diferente daquela verificada para a cultivar Pérola, ou seja, as plântulas da cultivar Pitiúba podem ter sofrido algum efeito iônico decorrente do tratamento salino.

Apesar disso, as plântulas da cultivar Pitiúba apresentaram melhor desempenho que as plântulas da cultivar Pérola em ambos os tratamentos. As plântulas da cultivar Pitiúba acumularam maior conteúdo de massa fresca e massa seca que as plântulas da cultivar Pérola em todos os tratamentos. Estas diferenças podem indicar maior habilidade da cultivar Pitiúba manter o crescimento em condições de estresse salino.

## 2.5. CONCLUSÃO

As cultivares Pérola e Pitiúba de feijão-caupi apresentaram respostas contrastantes à salinidade causada por NaCl, especialmente durante a germinação das sementes.

A cultivar Pérola se mostrou mais sensível e a cultivar Pitiúba mais resistente aos tratamentos salinos. Assim, características expressas nas sementes destas cultivares, como estrutura do tegumento e conteúdo de reservas podem influenciar sobremaneira o seu desempenho sob condições de estresse salino.

## 2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-NIEMI, T. S.; Campbell, W. F.; Rumbaugh, M. D. Response of alfafa cultivars to salinity during germination and post-germination growth. **Crop Science**, v.32, p.976-980, 1992.

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.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2<sup>nd</sup>. ed. New York: Plenum Press, 1994.

BLUMWALD, E.; AHARON, G. S.; APSE, M. P. Sodium transport in plant cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.140-151, 2000.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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

CHOUREY, K.; RAMANI, S.; APTE, S. K. Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.1165-1174, 2003.

CROSER, C.; RENAULT, S.; FRANKLIN, J.; ZWIAZEK, J. The effect of salinity on the emergence and seedling growth of *Picea mariana*, *Picea glauca* and *Pinus banksiana*. **Environmental Pollution**, v.115, p.9-16, 2001.

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

DELL'AQUILA, A. Effect of combined salt and heat treatments on germination and heat-shock protein synthesis in lentil seeds. **Physiologia Plantarum**, v.43, n.4, p.591-594, 2000.

DELL'AQUILA, A.; SPADA, P. The effect of salinity stress upon protein synthesis of germinating wheat embryos. **Annals of Botany**, v.72, p.97-101, 1993.

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

GRAXIOLA, R. A.; RAO, R.; SHERMAN, A.; GRISAFI, P.; ALPER, S. L.; FINK, G. R. The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNHX1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.1480-1485, 1999.

GULZAR, S.; KHAN, M. A. Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus lagopoides*. **Annals of Botany**, v.87, p.319-324, 2001.

HAMPSON, C. R.; SIMPSON, G. M. Effects of temperature, salt, and osmotic potential on early growth of wheat (*Triticum aestivum*). I. Germination. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.524-528, 1989.

HUANG, J.; REDMANN, R. E. Salt tolerance of *Hordeum* and *Brassica* species during germination and early seedling growth. **Canadian Journal of Plant Science**, v.75, p.815-819, 1995.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Effect of salt stress on germin gene expression in barley roots. **Plant Physiology**, v.110, p.971-977, 1996.

JOSHI, A. J.; MALI, B. S.; HINGLAJIA, H. Salt tolerance at germination and early growth of two forage grasses growing in marshy habitats. **Environmental and Experimental Botany**, v.54, p.267-274, 2005.

KATEMBE, W. J.; UNGAR, I. A.; MITCHELL, J. P. Effect of salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae). **Annals of Botany**, v.82, p.167-175, 1998.

KHAN, M. A.; UNGAR, I. A. The effect of salinity and temperature on the germination of polymorphic sedes and growth of *Atriplex triangularis* Willd. **American Journal of Botany**, v.71, n.4, p.481-489, 1984.

LI, W.; LIU, X.; KHAN, M. A.; Yamaguchi, S. The effect of plant growth regulators, nitric oxide, nitrate, nitrite and light on the germination of dimorphic seeds of *Suaeda salsa* under saline stress. **Journal of Plant Research**, v.118, p.207-214, 2005.

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

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

MYERS, B. A.; MORGAN, W. C. Germination of salt-tolerant grass *Diplacne fusca*. II. Salinity responses. **Australian Journal of Botany**, v.37, p.239-251, 1989.

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

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes: Avaliação da qualidade fisiológica**. Brasília: AGIPLAN, 1987.

RAMAGOPAL, S. Differential mRNA transcription during salinity stress in barley. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.84, p.94-98, 1987.

RAMAGOPAL, S. Inhibition of seed germination by salt and its subsequent effect on embryonic protein synthesis in barley. **Journal of Plant Physiology**, v.136, p.621-625, 1990.

RAMOLIYA, P. J.; PANDEY, A. N. Effect of increasing salt concentration on emergence, growth and survival of seedlings of *Salvadora oleoides* (Salvadoraceae). **Journal of Arid Environments**, v. 51, p.121-132, 2002.

RAMOLIYA, P. J.; PANDEY, A. N. Effect of salinization of soil on emergence, growth and survival of seedlings of *Cordia rothii*. **Forest Ecology and Management**, v.176, p.185-194, 2003.

RAMOLIYA, P. J.; PATEL, H. M.; PANDEY, A. N. Effect of salinization of soil on growth and macro- and micro-nutrient accumulation in seedlings of *Salvadora persica* (Salvadoraceae). **Forest Ecology and Management**, v.202, p.181-193, 2004.

REDMANN, R. E. Osmotic and specific ionic effects on the germination of alfalfa. **Canadian Journal of Botany**, v.52, p.803-808, 1972.

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

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

SREENIVASULU, N.; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PRAKASH, H. S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H. S.; SUDHAKAR, C. **Plant Science**, v.141, p.1-9, 1999.

THAKUR, M.; SHARMA, A. D. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: evidence suggesting a role of proline in seed germination. **Journal of Arid Environments**, v.62, p.517-523, 2005.

TSAI, Y.-C.; HONG, C.-Y.; LIU, L.-F.; KAO, C. H. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.291-299, 2005.

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

WAHID, A.; JAVED, I.-H.; ALI, I.; BAIG, A. RASUL, E. Short term incubation of sorghum caryopses in sodium chloride levels: changes in some pre- and post-germination physiological parameters. **Plant Science**, v.139, p.223-232, 1998.

YE, Y.; TAM, N. F.-Y.; LU, C.-Y.; WONG, Y.-S. Effects of salinity on germination, seedling growth and physiology of three salt-secreting mangrove species. **Aquatic Botany**, v.83, p.193-205, 2005.

ZAPATA, P. J.; SERRANO, M.; PRETEL, M. T. AMORÓS, A.; BOTELLA, M. A. Changes in ethylene evolution and polyamine profiles of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. **Plant Science**, v.164, p.557-563, 2003.



**CRESCIMENTO E PARTIÇÃO DIFERENCIAL DE ÍONS EM PLÂNTULAS DE  
FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] SUBMETIDAS AO ESTRESSE  
SALINO**

**CAPÍTULO 3**

**3.1. INTRODUÇÃO**

A salinidade dos solos é um fator ambiental que restringe a produção das culturas agrícolas em diversas partes do mundo, particularmente nas regiões áridas e semi-áridas (Greenway e Munns, 1980; Munns, 2002), onde afeta severamente a

dispersão e a produtividade vegetal (Kuznetsov e Shevyakova, 1997). Atualmente, 19,5% das terras irrigadas e 2,1% dos solos do planeta são afetados em alguma intensidade por sais (FAO, 2006). No Brasil, estima-se que 30% das áreas irrigadas dos projetos públicos apresentam problemas de salinização, e essas áreas estão concentradas principalmente no semi-árido nordestino (Bernardo, 1997). Nessas áreas as irregularidades pluviométricas, características do material de origem dos solos e elevadas taxas de evapo-transpiração, levam à salinização primária dos solos, enquanto práticas de irrigação, utilizando águas salinas, e o uso intensivo de fertilizantes podem levar à salinização secundária (Fageria e Gheyi, 1997).

O excesso de sais na solução do solo pode causar estresse osmótico nas culturas, pela redução do potencial hídrico do solo, e toxicidade iônica específica, em função do acúmulo excessivo de íons salino ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) no tecido vegetal. Os efeitos da salinidade sobre o metabolismo vegetal são complexos e atingem processos metabólicos associados ao déficit hídrico, desbalanço nutricional e iônico, comportamento estomático, eficiência fotossintética e capacidade de assimilação e alocação de carbono (Bohnert *et al.*, 1995). No curto espaço de tempo, minutos ou horas, o déficit hídrico celular, efeito osmótico da salinidade, parece ser o principal responsável pela redução da taxa de expansão e crescimento foliar (Munns e Termaat, 1986; Jacoby, 1994). Entretanto, com o passar do tempo, dias ou semanas, pode ocorrer toxicidade iônica em função do intenso acúmulo de íons salinos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) tóxicos ao metabolismo celular (Bernstein *et al.*, 1974), resultando em toxicidade iônica e desbalanço nutricional de importantes culturas: tomate (Pérez-Alfocea *et al.*, 1996; Kaya *et al.*, 2001), pimenta (Chartzoulakis e Klapaki, 2000) e *citrus* (Storey e Walker, 1998).

Interações competitivas entre  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ , e  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}/\text{K}^+$ , tanto no meio de cultivo como no tecido vegetal, podem resultar em desbalanço iônico podendo ocorrer deficiência nutricional dependendo de sua intensidade (Grieve e Shannon, 1999). Diversos trabalhos na literatura associam o estresse salino, induzido por NaCl, com deficiência nutricional em culturas. Por exemplo, altas concentrações de NaCl no meio de cultivo induz deficiência de nitrogênio e cálcio em tomate e melão (Cerdeira e Martinez, 1998), trigo e cevada (Ehret *et al.*, 1990), milho (Evlagon *et al.*, 1990) e tomate (Navarro *et al.*, 2000). No entanto, a resposta ao estresse salino pode variar amplamente entre as diferentes espécies vegetais em função de características distintas de tolerância a salinidade inerente a cada espécie (Savvas e

Lenz, 2000). A salinidade determinada pelo excesso de sais de  $\text{Na}^+$  reduz a disponibilidade de  $\text{Ca}^{+2}$ , o transporte e a mobilidade desse nutriente no tecido vegetal, afetando o desempenho de órgãos vegetativos e reprodutivos. O cálcio atua em mecanismos regulatórios do metabolismo celular (Ehret *et al.*, 1990), enquanto os íons  $\text{Na}^+$  podem competir com o  $\text{Ca}^{+2}$  pelos sítios de ligamento na membrana plasmática resultando na desestabilização estrutural e alteração funcional da plasmalema (Grattan e Grieve, 1999).

Sob condições fisiológicas típicas as plantas mantêm uma alta relação  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  no citosol, apresentando concentrações de  $\text{K}^+$  na faixa de 100 a 200mM e  $\text{Na}^+$  entre 1 – 10mM (Binzel *et al.*, 1988). O gradiente de potencial elétrico negativo (-140mV) da plasmalema e a elevada concentração de  $\text{Na}^+$  no meio extracelular proporcionam condição eletroquímica favorável para ocorrência de influxo passivo de  $\text{Na}^+$  do meio externo para o citosol (Higinbotham, 1973). Embora o(s) mecanismo(s) de absorção de  $\text{Na}^+$  em plantas ainda não estejam completamente esclarecidos, atualmente existem evidências experimentais que demonstram a ocorrência do influxo de  $\text{Na}^+$  através da plasmalema utilizando sistemas de transporte de  $\text{K}^+$ . As plantas utilizam sistemas de transportadores de alta afinidade, funcionais em meios com  $[\text{K}^+]$  em  $\mu\text{M}$ , e baixa afinidade, funcionais em meios com  $[\text{K}^+]$  em mM, para aquisição de potássio do meio extracelular (Maathuis e Amtmann, 1999). A similaridade físico-química existente entre os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , carga elétrica e raio iônico hidratado, são consideradas as principais causas do efeito inibitório do  $\text{Na}^+$  sobre os sistemas de absorção de  $\text{K}^+$  em plantas, onde interfere principalmente com o sistema de alta afinidade (Zhu, 2001).

A capacidade das plantas para enfrentar os efeitos adversos do estresse salino, no nível celular, está fortemente associada ao conteúdo de potássio celular. O potássio é um nutriente essencial para o ciclo de vida da planta, e para muitas espécies vegetais, cultivadas e não cultivadas, é o principal cátion inorgânico e possui diferentes funções metabólicas como: (a) balanceamento de cargas do citoplasma, onde contrabalança o excesso de cargas negativas oriundas de proteínas e ácidos nucléicos; (b) ativação (co-fator enzimático) de enzimas envolvidas em importantes vias metabólicas como na síntese de piruvato e (c) possui substancial contribuição na pressão osmótica do vacúolo contribuindo na manutenção do turgor e expansão celular (Kochian e Lucas, 1988; Maathuis e Sanders, 1996). O  $\text{Na}^+$  além de interferir com os sistemas de absorção de  $\text{K}^+$ ,

podendo comprometer a eficiência nutricional da planta, pode competir com  $K^+$  pelos sítios de ligação em enzimas onde o  $K^+$  atua como co-fator, e alterar vias metabólicas importantes do metabolismo celular. Dessa forma, a manutenção da alta relação  $K^+/Na^+$  celular pode representar um importante mecanismo de resistência ao estresse salino em plantas (Maathuis e Amtmann, 1999).

No presente capítulo foi avaliado o efeito do estresse salino, induzido por NaCl, sobre o acúmulo de massa seca, partição de  $Na^+$  e  $Cl^-$ , e acúmulo de  $K^+$  em raízes e folhas das cultivares de feijão-caupi Pitiúba e Pérola, visando associar essas variáveis fisiológicas (massa seca e acúmulo de íons) com a resistência à salinidade, durante o estabelecimento de plântulas.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Plantio e condução das plântulas**

Sementes das cultivares de feijão-caupi Pérola e Pitiúba foram semeadas em vasos plásticos de 0,8 L contendo areia de textura média e vermiculita de granulação média na proporção 1:1 (v/v) sob condições de casa de vegetação. Antes da mistura dos substratos a areia foi lavada exaustivamente em água destilada. Após a mistura da vermiculita com a areia avaliou-se a capacidade de campo, conforme descrito em Brasil (1992). Até o 4º dia após o semeio (DAS) os vasos foram supridos com água destilada até 70% da capacidade de saturação. A partir do 5º DAS os vasos foram irrigados diariamente com solução nutritiva diluída 1/10, conforme Hoagland e Arnon (1950). O volume de solução nutritiva usada em cada rega, a partir do 5º DAS, foi controlado através da fórmula:

$$V = (M_0 - M_1) \times 0,7$$

Onde: V: volume de solução (mL)

$M_0$ : massa da parcela (vaso+substrato+planta+água), (Kg)

$M_1$ : massa da parcela antes da rega (Kg)

Para obter número suficiente de parcelas foram montados 30 vasos com sementes da cv. Pitiúba e 30 com sementes da cv. Pérola. Cada vaso continha inicialmente 4 plântulas, as quais sofreram seleção parcial no 5º DAS, permanecendo somente 2 plântulas por vaso. Os vasos de cada cultivar foram separados em dois lotes de 15 vasos cada e identificados com fitas azuis (controle) e vermelhas (NaCl). Aos 15 DAS foi iniciado o tratamento salino, aplicando-se solução nutritiva de Hoagland a 1/10 de força, acrescida de NaCl 100 mM nos vasos com fita vermelha de cada cultivar. Os vasos com fitas azuis (controle) permaneceram recebendo a solução de Hoagland a 1/10 de força sem NaCl. O estudo foi realizado em dois experimentos: Um de curta duração, 8 dias de tratamento salino com amostragens (coletas) realizadas a intervalos de 2 dias, e outro de longa duração, com 20 dias de tratamento e amostragens realizadas a cada 4 dias. Antes de cada coleta os vasos eram transferidos para sala com condições controladas ( $25 \pm 2$  °C,  $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , umidade relativa de 70%).

### 3.2.2. Massa seca de folhas e raízes

A massa de raízes e folhas foi determinada após realização das amostragens (coletas) e secagem do material a 70°C durante 72 horas em estufa com ventilação de ar forçado. A análise do incremento de massa seca de folhas e raízes foi feita com base na regressão e correlação linear do conteúdo de massa seca em função do tempo de exposição ao NaCl.

### 3.2.3. Concentração de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>

As concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> em tecidos de folhas e raízes foram determinadas conforme Viégas *et al.* (2001). Tecidos de folhas e raízes secos em estufa foram pulverizados, com auxílio de gral e pistilo, e armazenados em frascos fechados a temperatura ambiente. Amostras contendo 50mg de farinha foram extraídas com 10mL de água deionizada, em tubos hermeticamente fechados, em banho-maria a 100°C durante 1h. Após o resfriamento os extratos foram filtrados, em ponteiras com filtro de algodão, e realizadas leituras em fotômetro de chama (Micronal, modelo B462) calibrado com soluções padrão de NaCl e KCl contendo 50 ppm de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, respectivamente. Os conteúdos (mmol Kg<sup>-1</sup>) de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram expressos na base de massa seca de folhas e raízes.

### 3.2.4. Concentração de Cl<sup>-</sup>

A concentração de Cl<sup>-</sup> em tecidos de folhas e raízes foi determinada conforme Viégas *et al.*, (2001). Tecidos secos em estufa, de folhas e raízes, foram pulverizados com auxílio de gral e pistilo, e armazenados à temperatura ambiente até o momento das determinações. Amostras contendo 100mg de farinha foram extraídas em 25mL de água deionizada, em tubos hermeticamente fechados, em banho-maria a 100°C por 1h. Após o resfriamento os extratos foram filtrados, em ponteiras com filtro de algodão, e alíquotas de 20mL foram tituladas com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) a 28mmol L<sup>-1</sup> utilizando dicromato de potássio (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) 5% (p/v) como indicador do final da reação.

### 3.2.5. Delineamento estatístico e análise dos dados

O presente estudo foi realizado em dois experimentos seqüenciais, ambos em delineamento inteiramente casualizado. No experimento de curta duração (8 dias) foi utilizado esquema fatorial 2x2x5, duas cultivares (Pitiúba e pérola), duas doses de NaCl (0 e 100mM) e cinco coletas (0, 2, 4, 6 e 8 dias), respectivamente, com quatro repetições. O experimento de longa duração (20 dias) foi conduzido em fatorial 2x4x6, duas cultivares, quatro doses de NaCl (0, 50, 100 e 200mM) e seis coletas (0, 4, 8, 12, 16 e 20 dias), respectivamente, com quatro repetições. Os dados foram analisados por regressão linear e valores de  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ .

## 3.3. RESULTADOS

### 3.3.1. Crescimento

Nos dois experimentos o tratamento salino induziu forte redução no acúmulo de massa seca em folhas e raízes nas duas cultivares (figuras 1 e 2). No entanto, a cultivar Pitiúba apresentou melhor capacidade de incremento de massa seca em folhas e raízes, comparada a cultivar Pérola, tanto no experimento de curta como de longa duração. No experimento de curta duração, 8 dias de exposição ao estresse salino, a análise de regressão do incremento de massa seca de folhas, em relação ao tempo de exposição a  $100 \text{mmol L}^{-1}$  de NaCl, apresentou coeficiente angular de 0,175 (com  $R^2$  0,97) e 0,08 (com  $R^2$  0,95), para Pitiúba e Pérola, respectivamente (tabela 1). Em raízes, esses valores foram de 0,103 ( $R^2$  0,98) e 0,067 ( $R^2$  0,93), para Pitiúba e Pérola, respectivamente (tabela 1). Esses resultados mostram que, na presença do sal (Tabela 1) plântulas da cultivar Pitiúba possuem taxas de incremento de massa seca de folhas e raízes, respectivamente de 2,18 e 1,53 vezes maiores, do que as plântulas da cultivar Pérola.

No experimento de longa duração, 20 dias de exposição ao estresse salino a capacidade de incremento de massa seca de folhas e raízes foi reduzida em ambos cultivares a partir de  $50 \text{mmol L}^{-1}$  de NaCl (Figura 2). Entretanto, a performance de crescimento do Pitiúba, observada no experimento de curta duração

foi reproduzida (Figuras 1 e 2). A análise de regressão do incremento de massa seca, revelou capacidade superior de crescimento do Pitiúba em relação a cultivar Pérola, em todas as concentrações de NaCl avaliadas (Tabela 2). O coeficiente angular da regressão do incremento de massa seca nas folhas da cultivar Pitiúba submetida a 50, 100 e 200mmol L<sup>-1</sup> de NaCl, foi 1,08 ( R<sup>2</sup> 0,98), 2,23 ( R<sup>2</sup> 0,97), 1,99 ( R<sup>2</sup> 0,99) vezes maior, respectivamente, comparado a cultivar Pérola para os mesmos níveis de NaCl (Tabela 2). Em raízes, foi observado resultado similar ao de folhas, onde a taxa de incremento (coeficiente angular) de massa seca da cultivar Pitiúba tratada com 50, 100 e 200mmol L<sup>-1</sup> de NaCl foi de 1,09 ( R<sup>2</sup> 0,96), 1,78 ( R<sup>2</sup> 0,99) e 2,23 ( R<sup>2</sup> 0,97) vezes maior, respectivamente, comparada a cultivar pérola (Tabela 2). Esses resultados demonstram que a cultivar Pitiúba possui melhor desempenho de crescimento comparado a cultivar Pérola, tanto no curto como longo tempo de exposição ao tratamento salino.



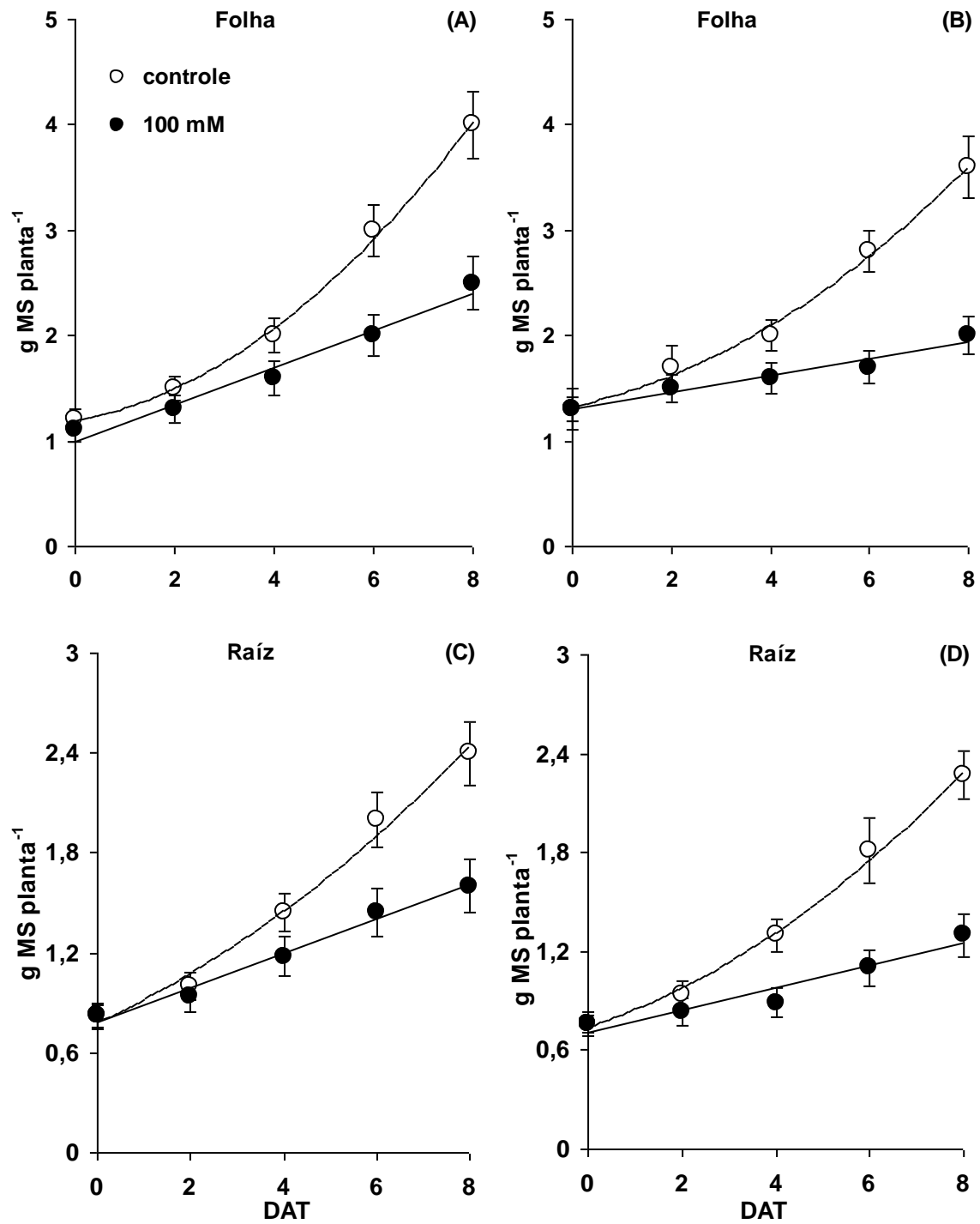


Figura 1: Massa seca de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivar Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (controle) e 100mM de NaCl durante 8 dias.

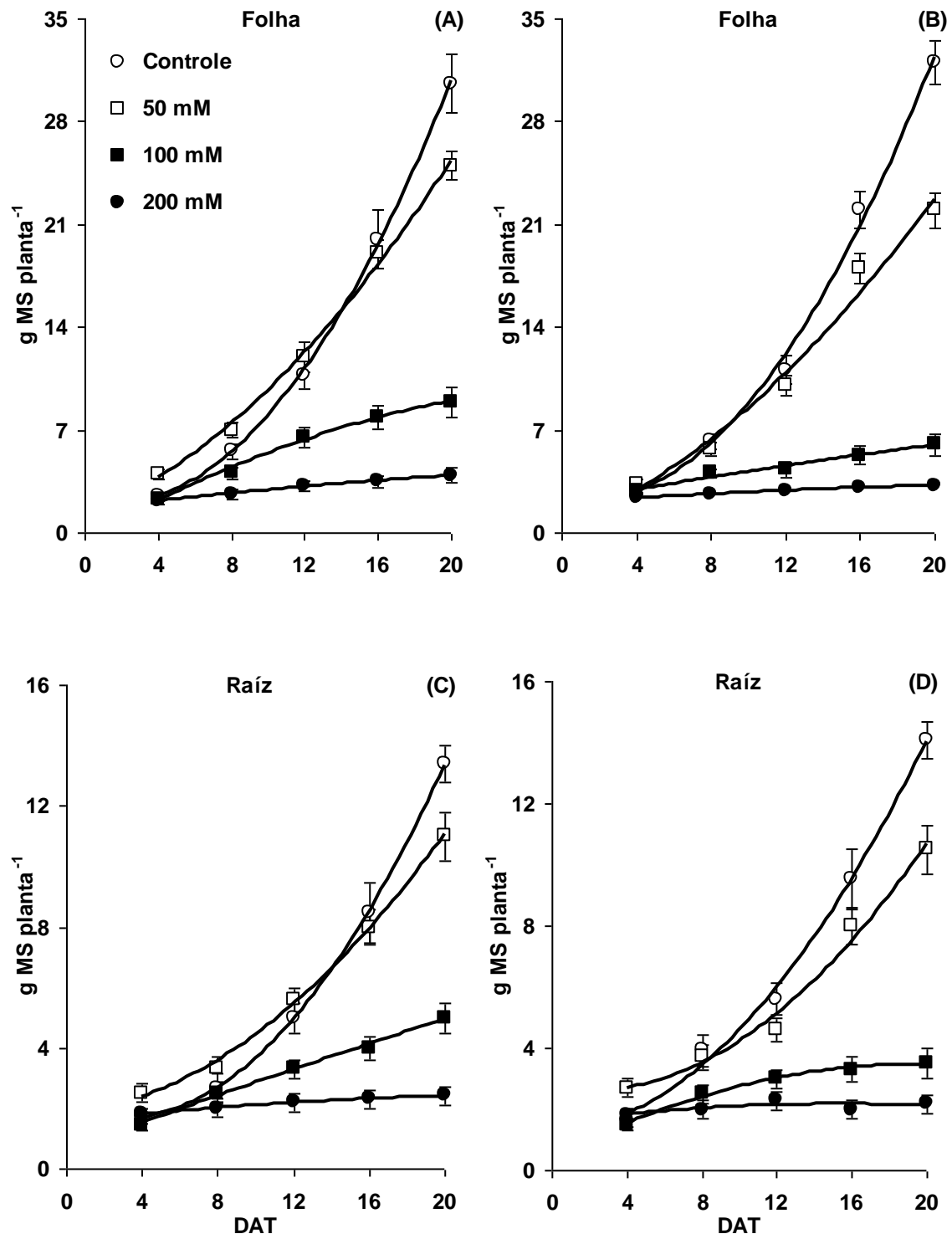


Figura 2: Massa seca de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivar Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a níveis crescentes de NaCl durante 20 dias.

Tabela 1: Análise de regressão do incremento de massa seca de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivares Pitiúba e Pérola, cultivadas na ausência (controle) e presença de 100 mM de NaCl, durante 8 dias.

Orgão	(NaCl) mmol L <sup>-1</sup>	Pitiúba		Pérola	
		Equação da reta	R <sup>2</sup>	Equação da reta	R <sup>2</sup>
Folhas	0	$y = 0,355x + 0,92$	0,949	$y = 0,285x + 1,14$	0,959
	100	$y = 0,175x + 1$	0,972	$y = 0,08x + 1,3$	0,955
Raiz	0	$y = 0,208x + 0,7$	0,977	$y = 0,1945x + 0,638$	0,973
	100	$y = 0,103x + 0,784$	0,987	$y = 0,0675x + 0,706$	0,931

Tabela 2: Análise de regressão do incremento de massa seca de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivares Pitiúba e Pérola, cultivadas na ausência (controle) e presença de 50, 100 e 200 mM de NaCl, durante 20 dias.

Orgão	(NaCl) mmol L <sup>-1</sup>	Pitiúba		Pérola	
		Equação da reta	R <sup>2</sup>	Equação da reta	R <sup>2</sup>
Folhas	0	$y = 1,7648x - 7,289$	0,949	$y = 1,8493x - 7,345$	0,949
	50	$y = 1,35x - 2,8$	0,981	$y = 1,2423x - 3,105$	0,968
	100	$y = 0,425x + 0,838$	0,977	$y = 0,1908x + 2,205$	0,969
	200	$y = 0,1078x + 1,789$	0,990	$y = 0,0547x + 2,169$	0,977
Raiz	0	$y = 0,7283x - 2,499$	0,935	$y = 0,7635x - 2,2$	0,961
	50	$y = 0,5425x - 0,43$	0,967	$y = 0,4975x - 0,07$	0,935
	100	$y = 0,2145x + 0,678$	0,995	$y = 0,1205x + 1,312$	0,901
	200	$y = 0,038x + 1,686$	0,973	$y = 0,0175x + 1,846$	0,377

### 3.3.2. Conteúdos de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup>

A exposição das plântulas a 100mmol L<sup>-1</sup> de NaCl, durante 8 dias, resultou em intenso acúmulo de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, em tecidos de folhas e raízes, das cultivares Pérola e Pitiúba (Figuras 3, 4 e 5). O acúmulo de Na<sup>+</sup> em folhas das duas cultivares ocorreu de forma proporcional ao tempo de exposição ao sal (Figuras 3 e 4). No entanto, o conteúdo de Na<sup>+</sup> em folhas da cultivar Pérola foi relativamente maior comparado a Pitiúba, a partir do sexto dia de tratamento (Figuras 3B e 4B). No experimento de curta duração (8 dias), o conteúdo de Na<sup>+</sup> em raízes foi duas vezes maior comparado ao conteúdo desse íon em folhas, nas duas cultivares (Figuras 3 e 4). Entretanto, após 20 dias de tratamento salino, o conteúdo de Na<sup>+</sup> em folhas da Pérola foi maior que em raízes (Figura 4). Vale chamar a atenção para o fato de que o acúmulo de Na<sup>+</sup> em raízes, em função do tempo, apresentou comportamento diferente do observado em folhas. Em raízes, o acúmulo de Na<sup>+</sup> ocorreu de forma intensa até o quarto dia de tratamento, apresentando uma estabilização, com conseqüente redução a partir do sexto dia de salinização das plântulas, tanto no ensaio de curta duração (Figuras 3C e D) como de longa duração (Figuras 4C e D).

O tratamento salino induziu forte acúmulo de Cl<sup>-</sup> em tecidos de folhas e raízes das duas cultivares (Figuras 5). Após oito dias de tratamento salino, o conteúdo de Cl<sup>-</sup> em folhas da cultivar Pitiúba foi duas vezes maior comparado a Pérola (Figuras 5A e B), enquanto que em raízes, o teor desse íon foi relativamente maior em Pérola (Figuras 5C e D). A deposição de Cl<sup>-</sup> em folhas foi proporcional ao tempo de exposição ao NaCl, enquanto em raízes, ocorreu incremento no conteúdo desse íon até o quarto dia de tratamento, seguido de estabilização no Pitiúba (Figura 5C) e redução no Pérola (Figura 5D), a partir desse período. O conteúdo de potássio em folhas não foi alterado em resposta a salinidade e ao tempo de exposição nas duas cultivares (Figura 6). Embora não tenha apresentado variações significativas em folhas, o conteúdo de K<sup>+</sup> foi reduzido em raízes em resposta ao incremento de NaCl na solução nutritiva, tanto na cultivar Pitiúba como na Pérola (Figuras 6C e D).

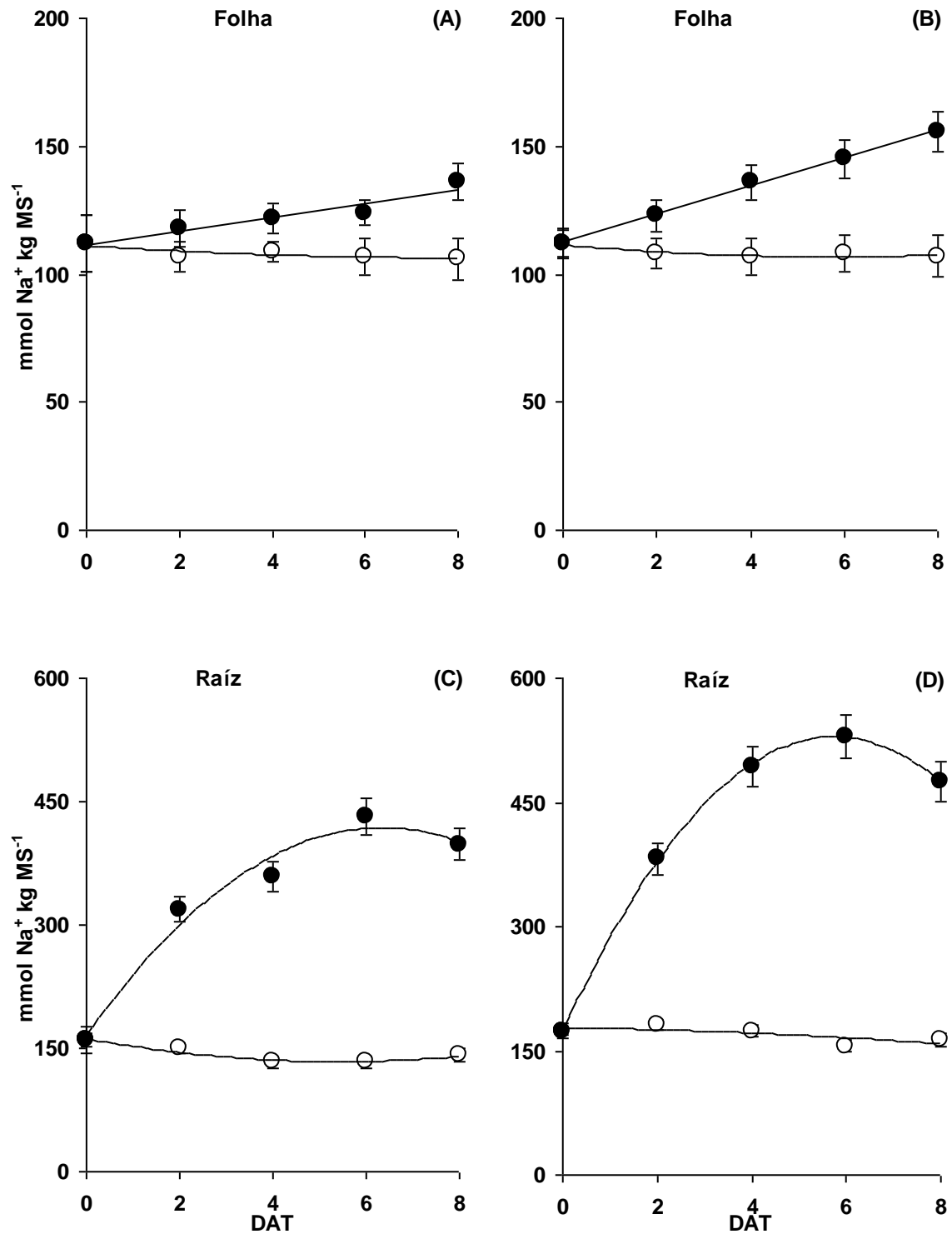


Figura 3: Conteúdo de sódio em tecidos de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivar Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (o) e 100  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl durante 8 dias.

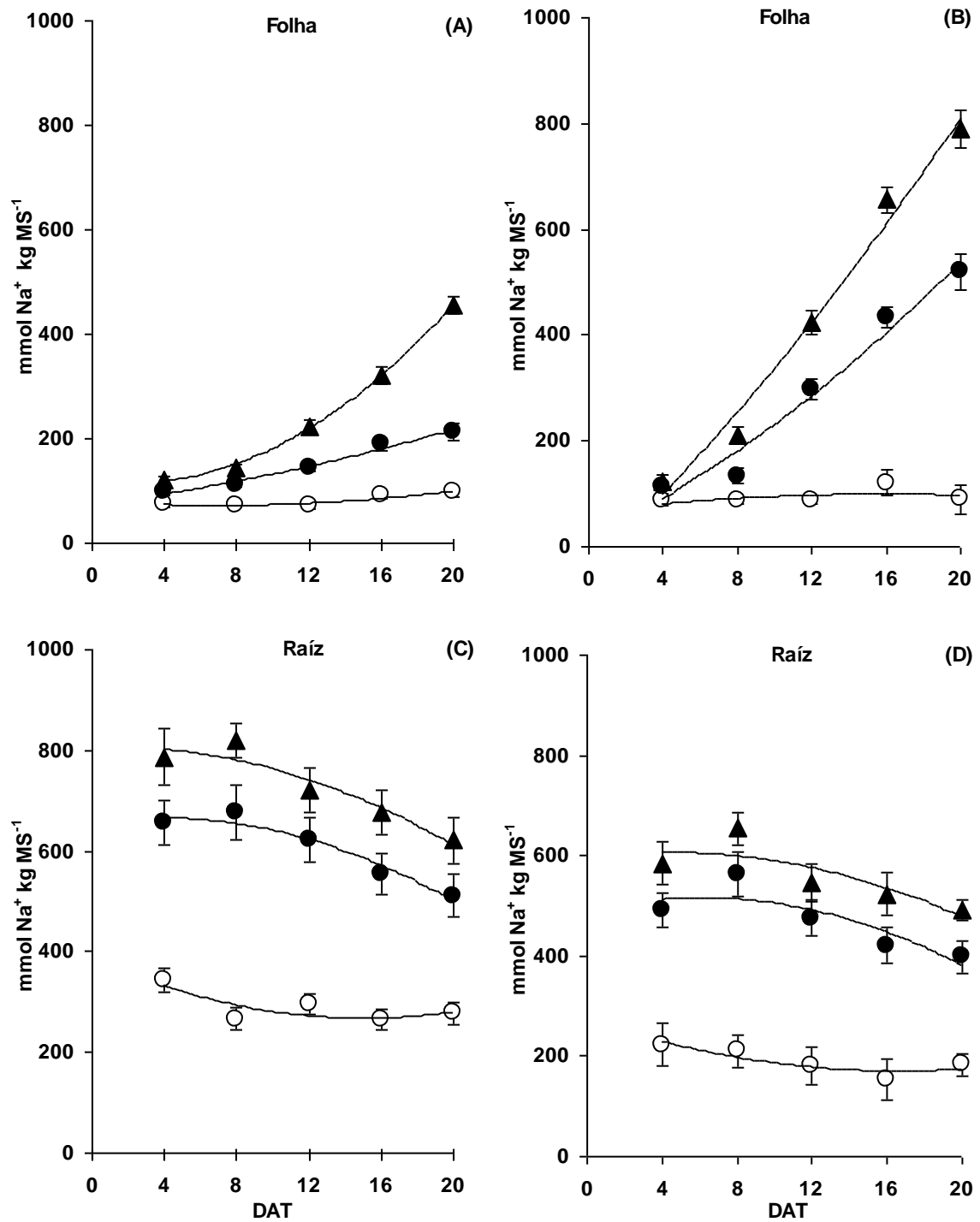


Figura 4: Conteúdo de sódio em folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivares Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (○) e 100mmol L<sup>-1</sup> (●) e 200mmol L<sup>-1</sup> (▲) de NaCl, durante 20 dias.

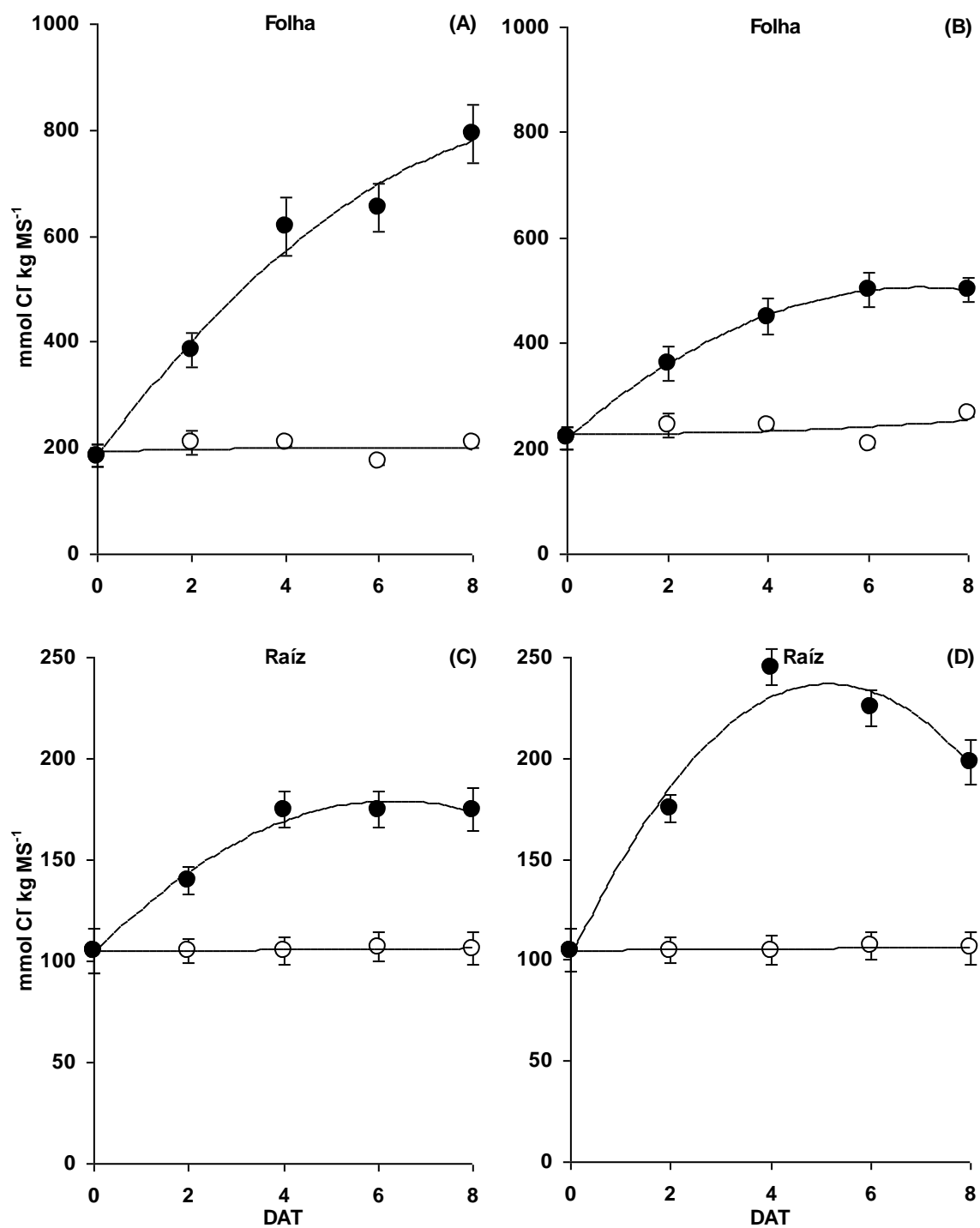


Figura 5: Conteúdo de cloreto em tecidos de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivares Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (o) e 100mmol L<sup>-1</sup> (●) de NaCl durante 8 dias.

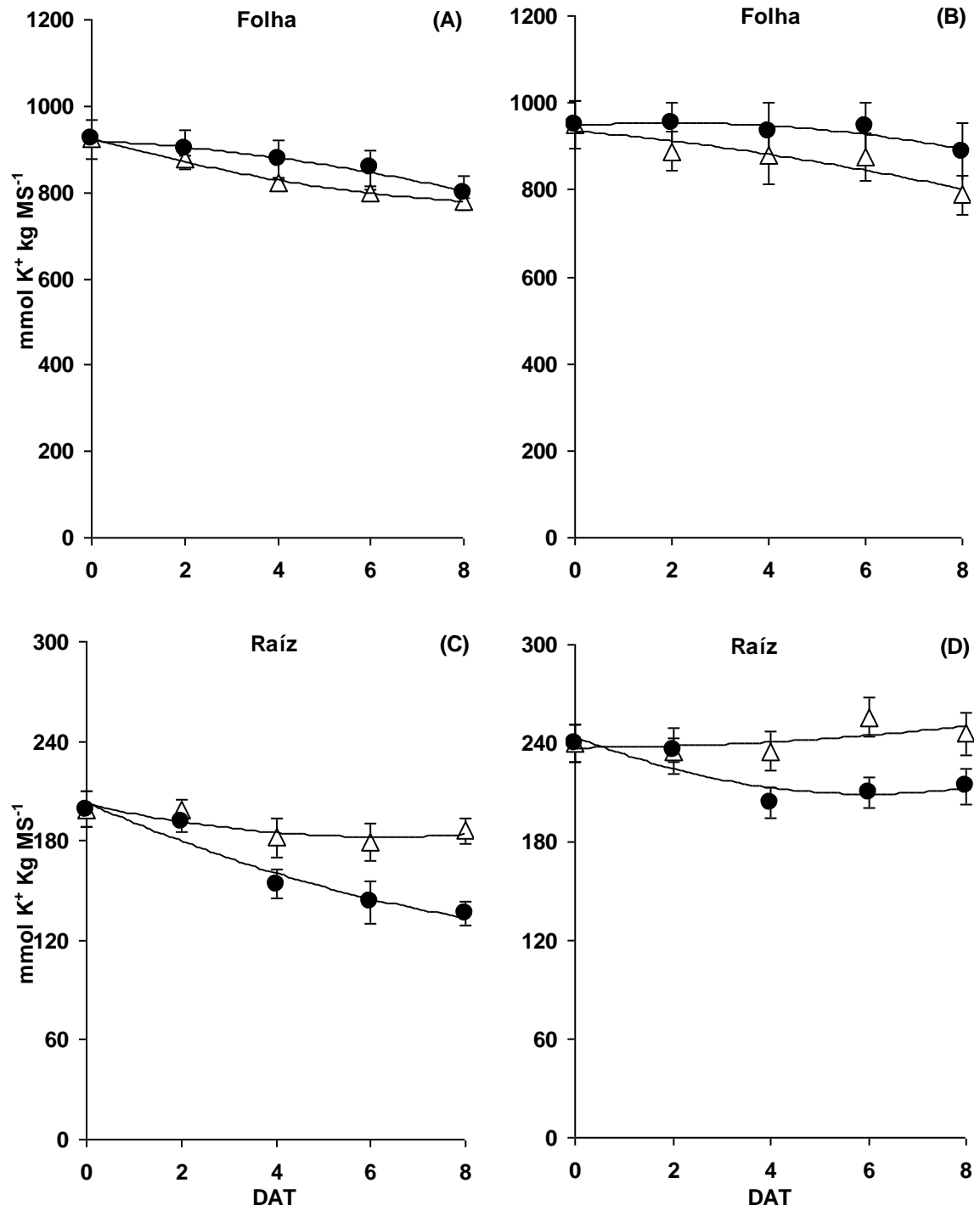


Figura 6: Conteúdo de potássio em tecidos de folhas e raízes de plântulas de feijão-caupi cultivares Pitiúba (A) e (C) e Pérola (B) e (D) submetidas a 0 (Δ) e 100mmol L<sup>-1</sup> (●) de NaCl durante 8 dias.



### 3.4. DISCUSSÃO

A resistência ao estresse salino em plantas está condicionada a diferentes mecanismos metabólicos relacionados com a manutenção da homeostase hídrica e iônica celular. No presente estudo foi avaliado a capacidade de incremento de massa seca, partição de íons salinos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) e acúmulo de  $\text{K}^+$ , em tecidos de folhas e raízes, de duas cultivares de feijão-caupi, submetidas à salinidade. A cultivar Pitiúba apresentou melhor capacidade de crescimento de folhas e raízes frente ao estresse salino, quando comparado a cultivar Pérola, tanto no experimento de curta (8 dias) como de longa duração (20 dias). A restrição do crescimento vegetal frente à salinidade é atribuída a efeitos adversos, desse fator de estresse, sobre processos metabólicos essenciais como a absorção e utilização de nutrientes (Grattana e Grieveb, 1999; Maathuis e Amtmann, 1999), eficiência fotossintética (Netondo *et al.*, 2004), absorção e assimilação de nitrogênio (Silveira *et al.*, 2003), fixação de carbono (García-Sanches *et al.*, 2002) e toxicidade iônica (Moya *et al.*, 2003).

A capacidade de manutenção de crescimento e produção, em níveis economicamente viáveis, é um critério adotado para classificação de culturas, ou cultivares, em mais e menos resistentes a salinidade (Ashraf e Ahmad, 2000). No presente estudo, a melhor taxa de crescimento da cultivar Pitiúba quando comparada a cultivar Pérola, em meio salinizado, demonstra sua maior resistência ao estresse salino na fase de estabelecimento de plântulas. Murillo-Amador *et al.* (2001), demonstraram que genótipos de feijão-caupi, mais resistentes à salinidade, possuem melhor produção de biomassa quando submetidos a  $170\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl nas fases emergência e crescimento inicial.

A melhor performance de incremento de massa seca, em folhas e raízes da cultivar Pitiúba (figuras 1 e 2), ocorreu associada ao menor conteúdo de  $\text{Na}^+$  em tecidos de folhas, tanto no experimento de curta como de longa duração (figuras 3 e 4). O acúmulo excessivo de  $\text{Na}^+$  na parte aérea de plantas, em condições de salinização dos solos, causa toxicidade iônica, resultando em perda de área foliar e conseqüente redução da atividade fotossintética, ocasionando redução de crescimento e produtividade (García-Sanches *et al.*, 2002). No geral, espécies e/ou genótipos que apresentam melhor capacidade de regular os processos de absorção e fluxo de  $\text{Na}^+$  para a parte aérea, em condições de salinidade elevada, apresentam

menor toxicidade foliar e melhor performance de crescimento (Wahomea *et al.*, 2001), e está associado a resistência ao estresse salino em diferentes genótipos de feijão-caupi (Murillo-Amador *et al.*, 2002).

Embora a absorção de sódio do meio externo seja um processo passivo (sem gasto de energia) os mecanismos de compartimentalização e exclusão celular do  $\text{Na}^+$  demandam energia. Os mecanismos responsáveis pela compartimentalização vacuolar e exclusão celular do  $\text{Na}^+$ , essenciais para desintoxicação citosólica sob condições de salinidade, são realizados por sistemas de contra-transporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizados no tonoplasto e plasmalema, respectivamente (Blumwald *et al.*, 2000). Esses dois sistemas de transporte, embora não utilizem energia metabólica diretamente, necessitam da manutenção do gradiente de  $\text{H}^+$  transmembranar, o qual é mantido pela ação de  $\text{H}^+$ ATPases localizadas no tonoplasto e plasmalema, respectivamente, e necessitam de energia na forma de ATP (Maathuis e Amtmann, 1999). Dessa forma, os sistemas de transporte de  $\text{Na}^+$  em plantas ocorre com gasto de energia indireto, que pode aumentar consideravelmente sob condições de salinidade, significando desvio de energia para outros processos metabólicos como o crescimento (Blumwald *et al.*, 2000).

Conforme observado no presente estudo, o conteúdo de  $\text{Na}^+$  em raízes de feijão-caupi apresentou uma forte tendência de redução a partir do sexto dia de tratamento salino, em todas as concentrações de NaCl testadas. Esse resultado pode refletir a ação de mecanismos de exclusão de  $\text{Na}^+$  radicular, podendo estar associado a uma alta eficiência de sistemas de contra-transporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  na plasmalema de células desse órgão, juntamente com aumento da atividade de  $\text{H}^+$ ATPases. A literatura aponta para aumentos significativos da atividade de contra-transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  da plasmalema sob condições de estresse salino em cevada (Ratner e Jacoby, 1976), tabaco (Watad, 1986), beterraba (Jacoby e Teomi, 1988), *Atriplex nummularia* (Hassidim, 1990), tomate (Mennen *et al.*, 1990; Wilson e Shannon, 1995) e *Dunaliella salina*, uma alga tolerantes a sal (Katx *et al.*, 1992). Em plantas de *Atriplex* submetidas à salinidade foi observado aumentos simultâneos na atividade de contra-transporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{H}^+$ ATPases (Braun *et al.*, 1986) e incrementos no nível de transcritos de  $\text{H}^+$ ATPases em plantas tratadas com 400mM de NaCl (Niu *et al.*, 1993).

### 3.5. CONCLUSÃO

A cultivar Pérola apresentou teores de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  mais elevados nas raízes que a cultivar Pitiúba.

Em folhas, a cultivar Pérola teve um discreto aumento de  $\text{Na}^+$ , uma queda no  $\text{Cl}^-$  e um comportamento similar ao  $\text{K}^+$  em relação a cultivar Pitiúba.

As cultivares Pérola e Pitiúba apresentam caráter excludor de  $\text{Na}^+$  do sistema radicular acumulando este íon preferencialmente na parte aérea.

A cultivar Pitiúba acumulou mais  $\text{Cl}^-$  nas folhas e apresentou melhor performance de crescimento, indicando que o  $\text{Cl}^-$  acumulado nas folhas não atingiu concentrações tóxicas, ou ainda, que a toxicidade iônica na espécie está associada principalmente ao  $\text{Na}^+$ .

### 3.6. BIBLIOGRAFIA

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

BERNARDO, S. Impacto ambiental da irrigação no Brasil. In: SILVA, D. D.; PRUSKI, F.F. (Ed.). Recursos hídricos e desenvolvimento sustentável da agricultura. Viçosa: MMA, SRH, ABEAS, UFV, 1997, 252 p.

BERNSTEIN, L.; FRANCOIS, L. E.; CLARK, R. A. Interactive effects of salinity and fertility on yields of grains and vegetables. **Agronomic Journal**, v. 66, p.412-421. 1974.

BINZEL, M.L.; HESS, F.D.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Intracellular Compartmentation of Ions in Salt Adapted Tobacco Cells. **Plant Physiology**, v. 86, p.607-614. 1988.

BLUMWALD, E.; AHARON, G. S.; APSE, M. P. Biochimica et Biophysica Acta Sodium transport in plant cells. v. 1465, p.140-151, 2000.

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

BRAUN, Y.; HASSIDIM, M. H.; LERNER, R.; REINHOLD, L. Studies on  $\text{H}^+$ -Translocating ATPases in Plants of Varying Resistance to Salinity: I. Salinity during Growth Modulates the Proton Pump in the Halophyte *Atriplex nummularia* **Plant Physiology**, v.81, p.1050-1056, 1986.

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

FAGERIA, N. K.; GHEYI, H. R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. p. 363-383. In manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 26, 1997. Campina Grande, **Anais...** Campina Grande: UFPB, 1997. p:363-383.

FAO Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>. Acesso em: 2006.

GARCIÁ-SANCHEZ, F.; JIFON, J. L.; CARVAJAL, M.; SYVERTSEN, J. P. Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> accumulation in 'Sunburst' mandarin grafted on different Rootstocks. **Plant Science**, v.162, p.705-712, 2002.

GRATTANA, S. R.; GRIEVEB, C. M. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v.78, p.127-157, 1999.

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

HASSIDIM, M.; BRAUN, Y.; LERNER, H. R.; REINHOLD, L. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport in Root Membrane Vesicles Isolated from the Halophyte *Atriplex* and the Glycophyte Cotton. **Plant Physiology**, v.94, p.1795-1801, 1990.

HIGINBOTHAM, N. Electropotentials of Plant Cells. **Annual Review of Plant Physiology**, v.24, p.25-46, 1973.

JACOBY, B. Mechanisms involved in salt tolerance by plants. In: Pessarakli, M. (Ed.), **Handbook of Plant and Crop Stress**. Marcel Dekker, New York, pp. 97-123. 1994.

KATZ, A.; PICK, U.; AVRON, M. Modulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter Activity by Extreme pH and Salt in the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. **Plant Physiology**, v.100, p.1224-1229, 1992.

KAYA, C.; KIRNAK, H.; HIGGS, D. Enhancement of growth and normal growth parameters by foliar application of potassium and phosphorus in tomato cultivars grown at high (NaCl) salinity. **Journal Plant Nutrition**. v.24, p.357-367, 2001.

KIEGLE, E. A.; BISSON, M. A. Plasma Membrane Na<sup>+</sup> Transport in a Salt-Tolerant Charophyte (Isotopic Fluxes, Electrophysiology, and Thermodynamics in Plants Adapted to Saltwater and Freshwater). **Plant Physiology**, v.111, p.1191-1197, 1996.

KUZNETSOV, V. V.; SHEVYAKOVA, N. I. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. **Physiol Plantarum**, v.100, p.320-326. 1997.

MAATHUIS, F.J.M.; AMTMANN, A. K<sup>+</sup> Nutrition and Na<sup>+</sup> Toxicity: The Basis of Cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> Ratios. **Annals of Botany**, v.84, p.123-133, 1999.

MOYA, J. L.; GOMEZ-CADENAZ, A.; PRIMI-MILLO, E.; TALON, M. Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.383, p.825-833, 2003.

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.

MURILLO-AMADOR, B.; LÓPEZ-AGUILAR, R.; KAYA, C.; LARRINAGA-MAYORAL, J.; FLORES-HERNÁNDEZ, A. Comparative effects of NaCl and Polyethylene Glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v. 188, p. 235-247, 2002.

MURILLO-AMADOR, B.; TROYO-DIÉGUEZ, E.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J.L.; LÓPEZ-AGUILAR, R.; ÁVILA-SERRANO, N.Y.; ZAMORA-SALGADO, S.; RUEDA-PUENTE, E. O.; KAYA, C. Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. **Scientia Horticulturae**, v.108, p. 423-431. 2006.

MURILLO-AMADOR, B.; TROYO-DIÉGUEZ, E.; LÓPEZ-CORTÉS, A.; JONES, H. G.; AYALA- CHAIREZ, F.; TINOCO-OJANGUREN, C. L. Salt tolerance of cowpea genotypes in the emergence stage. **Australian Journal Experimental Agricola**, v.41, p.1-8, 2001.

NETONDO, G. W.; ONYANGO, J. C.; BECK, E. Sorghum and Salinity: II. Gas Exchange and Chlorophyll Fluorescence of Sorghum under Salt Stress. **Crop Science**, v.44, p.806-811, 2004.

NIU, X.; NARASIMHAN, M. L.; SALZMAN, R. A.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. NaCl Regulation of Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Gene Expression in a Glycophyte and a Halophyte. **Plant Physiology**, v.103, p.713-718, 1993.

PÉREZ-ALFOCEA, F.; BALIBREA, M. E.; SANTA CRUZ, A., ESTAN, M. T. Agronomical and physiological characterisation of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. **Plant Soil**, v.180, p.251-257, 1996.

SAVVAS, D.; LENZ, F. Effects of NaCl or nutrient-induced salinity on growth, yield, and composition of eggplants grown in rockwool. **Scientia Horticulturae**. v.84, p. 37-47, 2000.

SILVEIRA, J. A. G.; MELO, A. R. B.; VIÉGAS, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, p.171-179, 2001.

STOREY, R.; WALKER, R. R. Citrus and salinity. **Scientia Horticulturae**, v.78, p.39-38, 1998.

VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G.; JUNIOR, A. R. L.; QUEIROZ, J. E.; Fausto, M. J. M. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.2, p.216-222, 2001.

WAHOMEA, P. K.; JESCHB, H. H.; GRITTNERB, I. Mechanisms of salt stress tolerance in two rose rootstocks: *Rosa chinensis* 'Major' and *R. rubiginosa*. **Scientia Horticulturae**. v.87. p.207-216, 2001.

WATAD, A. A.; PESCI, P. A.; REINHOLD, L.; LERNER, H. R. Proton Fluxes as a Response to External Salinity in Wild Type and NaCl-Adapted *Nicotiana* Cell Lines. *Plant Physiol*. v.81, p.454-459, 1986.

**RESPOSTA OXIDATIVA INDUZIDA POR SALINIDADE EM DUAS CULTIVARES  
FEIJÃO-CAUPI**

#### 4.1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi é uma espécie amplamente cultivada nas regiões semi-áridas da África e do Brasil. Algumas cultivares desta cultura são razoavelmente adaptadas a estresses abióticos tais como a seca e salinidade (Silveira *et al.* 2003). Esses estresses, atuando isoladamente ou combinados, podem induzir danos oxidativos nas plantas (Foyer e Noctor, 2000). As injúrias do efeito osmótico ou iônico causado pelo estresse salino podem promover o estresse oxidativo e/ou a inibição dos sistemas que operam no restabelecimento da homeostase para o controle de danos de estresse, reparo e desintoxicação (Hernández e Almansa, 2002).

O estresse oxidativo é caracterizado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) representadas predominantemente por ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esses podem ser vistos tanto como indicadores celulares de estresse ou como mensageiros envolvidos nas vias de sinalização de resposta ao estresse (Mittler, 2002). Contudo, acredita-se que a superprodução de EROs no cloroplasto de folhas durante uma condição de estresse induzida por seca ou salinidade seja o principal fator responsável por danos oxidativos em folhas (Foyer e Noctor, 2003). Contudo, os vegetais possuem mecanismos de defesa e utilizam várias estratégias bioquímicas para evitar danos causados por EROs. As defesas enzimáticas de plantas incluem enzimas antioxidantes, como peroxidase de fenóis (POX; EC 1.11.1.7), peroxidase de ascorbato (APX; EC 1.11.1.1), peroxidase de glutationa (GPX; EC 1.11.1.9), dismutase de superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), e catalase (CAT; EC 1.11.1.6) que, juntamente com outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, promovem a eliminação de EROs (Hernández *et al.*, 2001). As POX são amplamente distribuídas em vegetais superiores e protegem as células contra a ação destrutiva do  $H_2O_2$  pela catálise da decomposição de  $H_2O_2$ , através da oxidação de co-substratos fenólicos (Dionisio-Sese e Tobita, 1998; Sudhakar *et al.*, 2001; Lin e Kao, 2002). As APX catalisam a dismutação de  $H_2O_2$  para  $H_2O$  e  $O_2$  utilizando o ascorbato como substratos. Possuem a mesma ação da POX e utilizam como co-substrato o ascorbato reduzido. Essa enzima está presente principalmente em citosol, mitocôndrias e cloroplastos (Shigeoka *et al.* 2002). As SOD catalisam a dismutação do  $O_2^-$  para  $H_2O_2$  e  $O_2$ . As CAT estão presentes nos peroxissomas de



quase todas as células aeróbicas e virtualmente ausentes nos cloroplastos (Dionísio-Sese e Tobita, 1998). Essas enzimas podem proteger as células pela catálise da decomposição de  $H_2O_2$  para  $O_2$  e  $H_2O$  (Foyer e Noctor, 2000). O sistema de defesa bioquímica também inclui carotenóides, ascorbato, glutatona e tocoferóis como antioxidantes não enzimáticos (Noctor e Foyer, 1998).

Embora vários trabalhos forneçam evidências de um papel protetor efetivo do sistema SOD-CAT-APX-POX contra estresse oxidativo em diversas espécies vegetais (Mittler, 2002; Vaidyanathan *et al.*, 2003; Jung, 2004), algumas questões ainda permanecem sem esclarecimento. Uma delas é se o aumento na atividade de POX está relacionado à eliminação de  $H_2O_2$  “per se”, ou se essa enzima promove o aumento do processo de lignificação que provoca o envelhecimento precoce de tecidos em resposta ao estresse salino (Zheng e Van Huystee, 1992; Dionísio-Sese e Tobita, 1998). Outro ponto controverso é a falta de informações conclusivas sobre a eficiência de enzimas antioxidativas durante a recuperação ao estresse osmótico (Jung, 2004). Assim, com o intuito de auxiliar na elucidação desses questionamentos foram realizados experimentos com plantas de feijão-caupi sob tratamento salino. O presente estudo teve como objetivo avaliar a importância do sistema SOD-APX-CAT-POX na resposta de folhas de feijão-caupi ao tratamento salino.

## **4.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1. Estratégia experimental e condições de semeio**

Sementes das cultivares (cv.) Pérola e Pitiúba foram semeadas em vasos plásticos de 800 mL sob condições de casa de vegetação. O substrato foi preparado com uma mistura de areia de rio e vermiculita de granulação média, na proporção de 1:1 (v/v). Antes do preparo do substrato, a areia utilizada foi lavada exaustivamente em água destilada. Após a mistura da vermiculita com a areia avaliou-se a capacidade de campo, conforme descrito em Brasil (1992). Até o 4º dia após o semeio (DAS) os vasos foram supridos com água destilada até 70% da capacidade de saturação. A partir do 5º DAS, diariamente, realizou-se a rega dos vasos com solução de nutritiva de Hoagland a 1/10 da força (Hoagland e Arnon, 1950). O volume de solução nutritiva usada em cada rega foi controlado através da fórmula:

$$V=(M_0 - M_1) \times 0,7$$

Onde:

V: volume de solução em mL

M<sub>0</sub>: massa da parcela (vaso+substrato+planta+água), (g)

M<sub>1</sub>: massa da parcela antes da rega (g)

Para obter número suficiente de parcelas foram montados 30 vasos com sementes da cv. Pitiúba e 30 com sementes da cv. Pérola. Cada vaso continha inicialmente 4 plântulas, as quais sofreram seleção parcial no 5º DAS, permanecendo somente 2 plântulas por vaso. Os vasos de cada cultivar foram separados em dois lotes de 15 cada e identificados com fitas azuis (controle) e vermelhas (NaCl). Aos 15 DAS, foi iniciado o tratamento salino, aplicando-se solução nutritiva de Hoagland a 1/10 de força acrescida de NaCl 100 mM em metade dos vasos de cada cultivar. Os vasos restantes permaneceram sob as condições originais (controle). As colheitas das plantas (controle e submetidas a 100 mM de NaCl) foram feitas aos 0, 2, 4, 6 e 8 dias após o início do tratamento (DAIT). Em cada colheita, sempre às 8:00h da manhã, os vasos foram transferidos para sala de crescimento com condições controladas (25±2 °C, 240 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, umidade relativa de 70%). Após 2 horas de aclimatação na câmara de crescimento, amostras de folhas trifoliadas, totalmente expandidas, foram imediatamente coletadas e mensurada a massa fresca. No 6º DAIT, amostras de folhas trifoliadas foram congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas a -80 °C para determinação das atividades enzimáticas. As amostras foram utilizadas para a determinação “*in vivo*” de vazamento de eletrólitos e conteúdo relativo de água. As massas frescas de raízes e parte aérea foram coletadas em cada época para determinação da taxa de crescimento relativo.

#### **4.2.2. Determinação da taxa de crescimento relativo da parte aérea**

A taxa de crescimento relativo da planta foi determinada pela razão do ganho percentual de massa seca, em duas mensurações consecutivas. Para tanto, foram coletadas, amostras de plantas (parte aérea+raiz) do 6º e 8º DAIT e mensuradas as massas frescas. As amostras foram então colocadas em estufa a

60°C por 48h, obtendo-se assim a massa seca das amostras. O percentual de massa seca (%MS) foi calculado, através da equação:

$$\%MS = MS_{(g)} \times 100 / MF_{(g)}$$

onde MS é o valor em gramas de massa seca e MF, o valor em gramas de massa fresca da amostra.

Em seguida, o valor de massa seca total ( $MS_t$ ) foi obtido, através da equação:

$$MS_t = MF_t \times MS\%$$

onde  $MF_t$  é o valor de massa fresca total, obtida durante as coletas e  $MS\%$  é o percentual de massa seca.

Finalmente, o crescimento relativo de parte aérea (TCR) foi obtido através da equação:

$$TCR = \frac{MS_2 - MS_1}{T_2 - T_1}$$

onde,  $MS_2$  equivale a massa seca foliar total do 8º DAIT o  $MS_1$ , a massa seca total no 6º DAiT e  $T_2 - T_1$  equivale ao intervalo de tempo entre as duas observações.

#### **4.2.3. Conteúdo relativo de água (C.R.A.)**

Para avaliar o conteúdo relativo de água (C.R.A.) foi utilizada a metodologia descrita por Cairo (1995). Para tanto, 30 discos foliares com 1 cm de diâmetro foram coletados com auxílio de vazadores e imediatamente pesados em balança analítica. O valor obtido foi denominado de massa fresca ( $MF_1$ ). Após essa etapa, o material foi transferido para Erlenmeyers contendo 10 mL de H<sub>2</sub>O deionizada e mantidos em repouso, com iluminação e temperatura ambiente (25 °C), durante 6 horas.

Após o tempo decorrido, os discos foram secados em papel toalha e posteriormente pesados para quantificar a massa túrgida dos segmentos ( $MF_2$ ). Para

determinar o valor de massa seca, os discos foram transferidos para sacos de papel e colocados em estufa a 70°C, por um período de 48 horas. Em seguida, foram pesados e o valor obtido denominado de massa seca (MS). O conteúdo relativo de água foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{C.R.A.} = \frac{\text{MF}_1 - \text{MS}}{\text{MF}_2 - \text{MS}} \times 100$$

onde C.R.A. equivale ao conteúdo relativo de água em percentual,  $\text{MF}_1$  à massa fresca dos discos,  $\text{MF}_2$  à massa de tecido túrgido, e MS, ao teor de massa seca.

#### 4.2.4. Vazamento de eletrólitos

A metodologia utilizada foi adaptada de Blum e Ebercon (1981). Durante a coleta 20 discos foliares, com 1 cm de diâmetro, foram coletados com o auxílio de vazadores. Os discos foram lavados em solução de  $\text{Ca}_2\text{SO}_4$  0,1 mM, por 1 minuto, enxaguados três vezes em água deionizada e mantidos em repouso por 30 minutos, no último enxágüe. Em seguida, os segmentos foram colocados em tubos contendo 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada, e fechados hermeticamente. Os tubos ficaram em repouso por 6 horas, à temperatura ambiente e agitação ocasional. Decorrido o tempo estabelecido, a solução que estava em contato com os segmentos foi transferida para outro tubo de ensaio e a primeira leitura de condutividade ( $L_1$ ), foi determinada em condutivímetro. A solução foi devolvida para os tubos com tampa e estes, fechados hermeticamente, foram aquecidos em banho-maria a 100 °C por 60 minutos. Depois de resfriar até a temperatura ambiente, a solução de contato foi novamente transferida para outros tubos de ensaio e novas leituras ( $L_2$ ), realizadas. O resultado foi expresso em % de vazamento de eletrólitos (%VE), de acordo com a equação:  $\%VE = L_1 \times 100 / L_2$ .

#### 4.2.5. Concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação de lipídios foi mensurada a partir da quantidade de malonaldeído (MDA) do extrato de folhas, através de reação específica deste, com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O método utilizado foi descrito inicialmente por Heath e Packer (1968) e adaptado por Peixoto *et al.* (1999). Para o ensaio 25 mg de farinha

lioofilizada de folhas foram maceradas com almofariz e pistilo, seguida da adição de 2 mL da solução de TCA a 1 % (m/v). A mistura foi, então, macerada continuamente por mais 2 minutos. Os extratos foram acondicionados em tubos tipo Eppendorf de 2 mL e centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi descartado.

Para o ensaio, os extratos foram diluídos, quando necessário. Alíquota de 500 µL foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais adicionou-se 2 mL de reagente contendo TBA a 0,5 % (m/v), dissolvido em TCA a 20 % (m/v). Os tubos foram hermeticamente fechados e a mistura de reação incubada a 95 °C por 1 hora, sendo, em seguida, resfriada em banho de gelo. Quando necessário, as amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente por 10 minutos a 9.000 x g. As leituras foram realizadas a 25 °C nas absorvâncias de 532 e 660 nm, respectivamente (esta última, relativo aos interferentes). A segunda leitura foi subtraída da primeira para obtenção da leitura específica e a quantidade do complexo MDA-TBA formado foi calculado através do coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Heath e Packer, 1968). Os resultados foram expressos em nmol g<sup>-1</sup> MS.

#### **4.2.6. Extração e determinação das concentrações de proteínas solúveis**

O processo de extração foi adaptado a partir de Peixoto *et al.* (1999). Durante a coleta, 1 g de tecido foliar foi macerado com almofariz e pistilo na presença de nitrogênio líquido até obtenção de farinha homogênea. Padronizou-se que o tecido foliar seria coletado da região mediana das folhas do 3º trifolíolo. Em seguida, 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 contendo ácido L-ascórbico 1 mM, EDTA 0,1 mM foi adicionado, macerando por mais 5 minutos. O macerado foi transferido para tubos de centrífuga e centrifugados a 13.000 x g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante, considerado fração de proteínas solúveis totais, foi coletado e armazenado -80 °C, para determinações posteriores.

A determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). O método é baseado na mudança da coloração do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 quando ligado a proteínas. Os extratos congelados foram lentamente descongelados em banho de gelo (±4 °C). As amostras foram diluídas no próprio tampão de extração, na proporção de 1:10

(v/v). Alíquotas de 100 µL do extrato diluído foram transferidas para tubos de ensaio e 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados ao meio de reação.

Após leve agitação, os tubos foram incubados a 25 °C por 15 minutos e então realizada leitura da reação a 595 nm. A concentração de proteínas totais foi obtida pela comparação das leituras, com as obtidas em curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). A concentração de proteínas solúveis foi expressa em mg de proteína g<sup>-1</sup> MS.

#### **4.2.7. Atividade de dismutases de superóxido (SOD) (EC 1.15.1.1)**

A atividade de SOD foi determinada segundo método adaptado de Gianopolitis e Ries (1977). Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (*p*-nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. Neste ensaio, uma unidade de atividade enzimática (UA) de SOD, foi considerada como a quantidade de enzima necessária para obter 50 % de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático.

As amostras foram aquelas utilizadas para determinação do teor de proteínas solúveis totais (item 4.2.6.). Para tanto, os extratos foram lentamente descongelados em banho de gelo e diluídos no próprio tampão de extração. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para tubos de ensaios protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, L-metionina 13 mM e NBT 75 µM.

A reação foi iniciada pela adição de 2 µM de Riboflavina e a concomitante transferência dos tubos para uma câmara iluminada, por uma lâmpada fluorescente 30 Watts, por 15 minutos. As leituras foram tomadas a 560 nm. Para efeito de correção nos cálculos, o branco da reação foi considerado como sendo os tubos que não continham extrato, expostos e não expostos à luz. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibiu 50 % da redução de NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971) e expressa em UA g<sup>-1</sup> MS min<sup>-1</sup>.

#### **4.2.8. Atividade de catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)**

A atividade de catalase nos tecidos foliares foi determinada de acordo com o método de Sudhakar *et al.* (2001), adaptado por Peixoto *et al.* (1999). O

ensaio avalia a velocidade de consumo de  $H_2O_2$  no meio de reação, na absorbância de 240nm. As alíquotas de 50 $\mu$ L do extrato enzimático bruto foram adicionadas a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,0 a 30°C, acrescido de  $H_2O_2$  20mM (Havir e McHale, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240nm em tempo de reação de 2 minutos. A atividade de CAT foi calculada, considerando a redução de 1 unidade de absorbância como equivalente a 1 UA e os dados foram expressos em UA  $g^{-1}$  MS  $min^{-1}$ .

#### **4.2.9. Atividade de peroxidases de ascorbato (APX) (EC 1.11.1.11)**

A atividade de APX foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), modificado por Koshiba (1993), onde a presença de APX no extrato bruto reduz o peróxido de hidrogênio do meio, pela oxidação do ácido ascórbico fornecido. Para tanto, o primeiro extrato obtido no item 2.6. foi utilizado. Alíquotas de 100  $\mu$ L dos extratos foram transferidos para tubos de ensaio. Ao meio de reação foram adicionados 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0, contendo ácido L-ascórbico 0,8 mM.

O experimento foi iniciado pela adição de  $H_2O_2$  ao meio de reação, observando o decréscimo da absorbância no intervalo de 60 segundos, a 290 nm. Adicionalmente, leituras de tubos controles, com e sem a amostra, na ausência de peróxido de hidrogênio, foram realizadas. Para efeito de cálculo, foi considerado que o decréscimo de 1 unidade de absorbância equivalia a 1 unidade de atividade (UA). As atividades do extrato total foram determinadas pelo cálculo da quantidade de extrato que reduziu a leitura de absorbância em 1 UA e expressos em UA  $g^{-1}$  MS  $min^{-1}$ .

#### **4.2.10. Atividade de peroxidases de fenóis (POX) (EC 1.11.1.7)**

A atividade de POX nos tecidos foliares foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Neste método, enzimas do extrato bruto oxidam o guaiacol para a produção de purpurogalina e redução concomitante de  $H_2O_2$ , fornecido ao meio. Alíquotas de 20  $\mu$ L do extrato de proteínas solúveis totais, obtidos no item 2.6.,

foram transferidas para tubos de ensaio e a estes, adicionados 4,9 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, contendo ácido pirogálico 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM.

A mistura foi incubada a 25 °C, por período de 60 segundos e a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 % (v/v). As leituras foram tomadas à absorvância de 420 nm contra um branco preparado com 5 ml do tampão de ensaio e 0,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,5 % (v/v). A atividade de POX foi calculada, considerando o aumento de 1 unidade de absorvância como equivale a 1 UA e os dados expressos em UA g<sup>-1</sup> MS min<sup>-1</sup>.

### 4.3. RESULTADOS

Para analisar respostas antioxidativas e de crescimento em folhas de feijão-caupi, plantas das cv. Pérola e Pitiúba foram expostas a NaCl 100mM, aplicado no substrato. Durante a germinação e primeiros estádios fisiológicos, as plantas da cv. Pérola apresentaram atraso de crescimento. Contudo, no estágio vegetativo selecionado para a experimentação, as plantas se apresentaram visualmente no mesmo estágio fisiológico (Figura 1A e B).

Aos 21 DAS, todas as plantas apresentaram o 2º trifolíolo inteiramente expandido, mesmo sob tratamento de NaCl 100mM. Entretanto, as plantas tratadas estavam bem menores do que as plantas controle (Figura 1A e B). O efeito do NaCl no crescimento pode ser observado através da figura 2A, onde, a TCR das duas cultivares não diferiu significativamente, mesmo sob condições de estresse salino. Contudo, ambas apresentaram redução da taxa de crescimento em torno de 70%, quando tratadas com NaCl 100mM. Para avaliar o efeito do NaCl no grau de hidratação dos tecidos foliares foi determinado o C.R.A. Sob condições de tratamento salino, essa variável apresentou redução em torno de 25% em ambas as cultivares, indicando que o estresse aplicado influenciou no “status” hídrico foliar igualmente nas duas cultivares (Figura 2B).



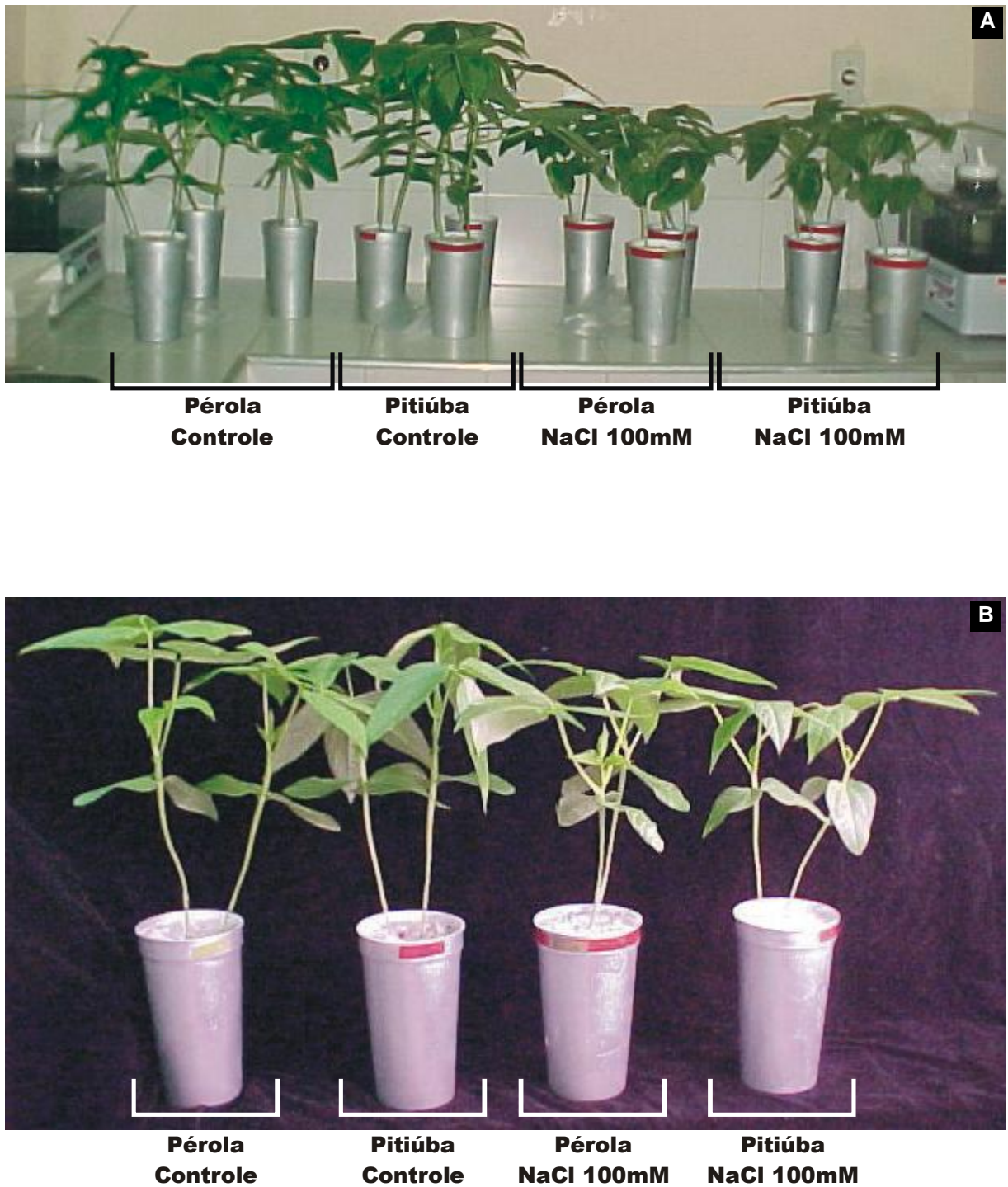


Figura 1: Aspecto visual das plantas de *V. unguiculata* cv. Pérola e Pitiúba no último dia de coleta (21 DAS). Distribuição das plantas no ambiente de câmara de crescimento [A]. Visão detalhada das plantas de cada tratamento [B]. Plantas mantidas sob condições normais de crescimento (Pérola – Controle e Pitiúba - Controle). Plantas mantidas sob tratamento com NaCl 100mM (Pérola – NaCl 100mM e Pitiúba – NaCl 100mM).

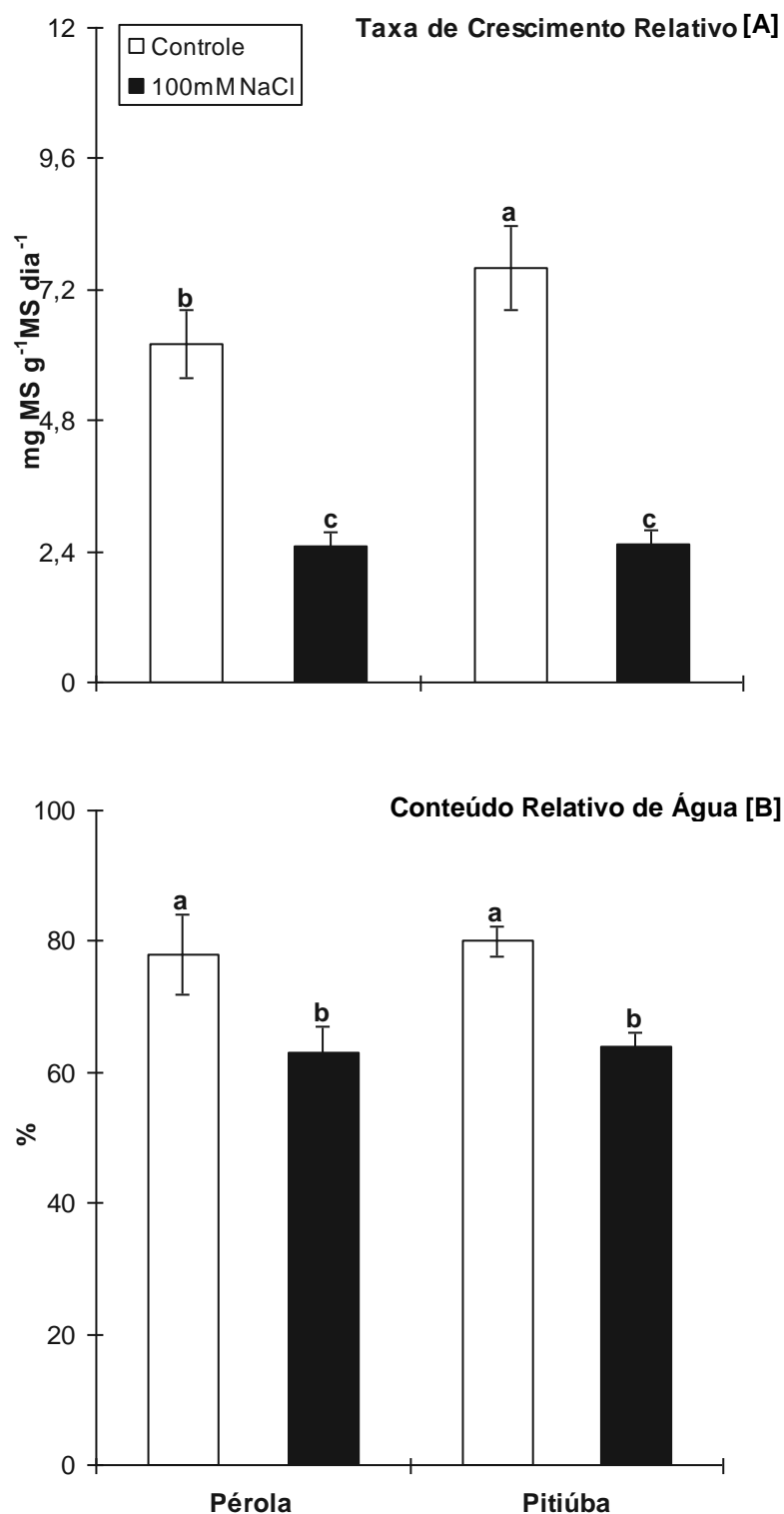


Figura 2: Taxa de Crescimento Relativo (A) e conteúdo relativo de água (B) de folhas de feijão-caupi cv. Pérola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM (■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O tratamento com NaCl causou um aumento significativo no vazamento de eletrólitos de ambas as cultivares. Contudo, verificou-se que a cv. Pitiúba apresentou um valor 14% maior do que a cv. Pérola. Os resultados apresentados nos níveis de TBARS foram semelhantes aos observados anteriormente para vazamento de eletrólitos, ou seja, o NaCl induziu aumentos mais proeminentes na cv. Pitiúba (17%), comparando com a cv. Pérola, embora esses aumentos tenham sido menos drásticos.

No caso da POX, sua atividade está também diretamente relacionada com a lignificação da parede celular, restringindo o crescimento. Previamente, folhas dos cv. Pérola e Pitiúba foram submetidas à dosagem de proteínas solúveis. Essa variável não apresentou diferença estatística significativa entre os controles e os tratamentos, nem entre as duas cultivares, nas duas condições (Figura 4).

No tocante aos resultados das atividades das enzimas nas folhas, observou-se que a atividade de SOD foi aumentada em ambas as cultivares por efeito do NaCl. Entretanto, houve um aumento relativo mais pronunciado na cv. Pitiúba (Figura 5A). Surpreendentemente, a atividade de CAT sofreu profunda redução, igualmente nas duas cultivares (Figura 5B), em torno de 75%, comparado aos controles. Já a resposta da atividade de APX foi similar a da SOD (Figura 6A), ou seja, o NaCl induziu um aumento mais pronunciado na cv. Pitiúba. Interessantemente, a atividade de POX foi a que sofreu mais profundas mudanças por efeito do tratamento salino (Figura 6B).

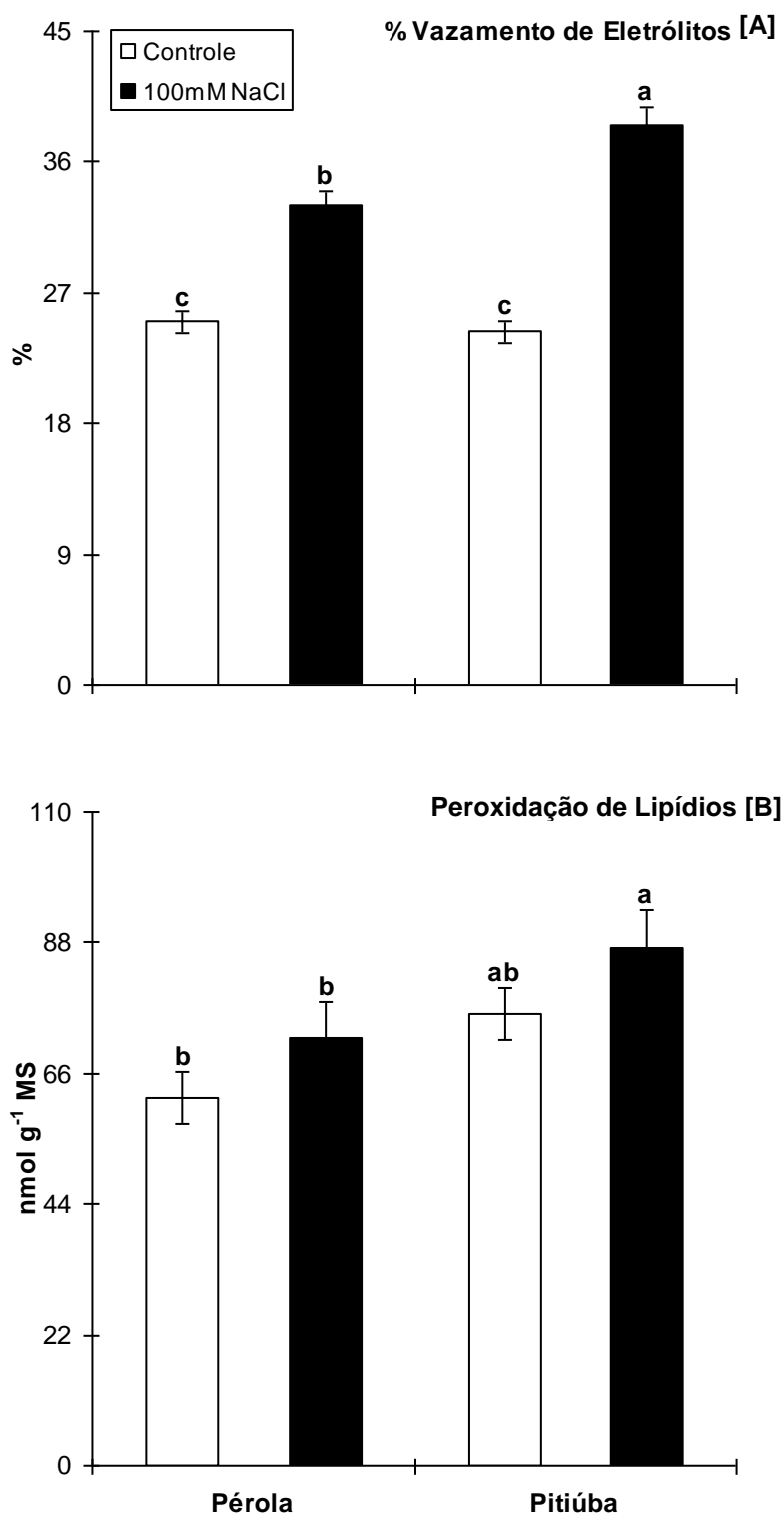


Figura 3: Percentual de vazamento de eletrólitos [A] e peroxidação de lipídios (TBARS) [B] de folhas de feijão-caupi cv. Pêrola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM (■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

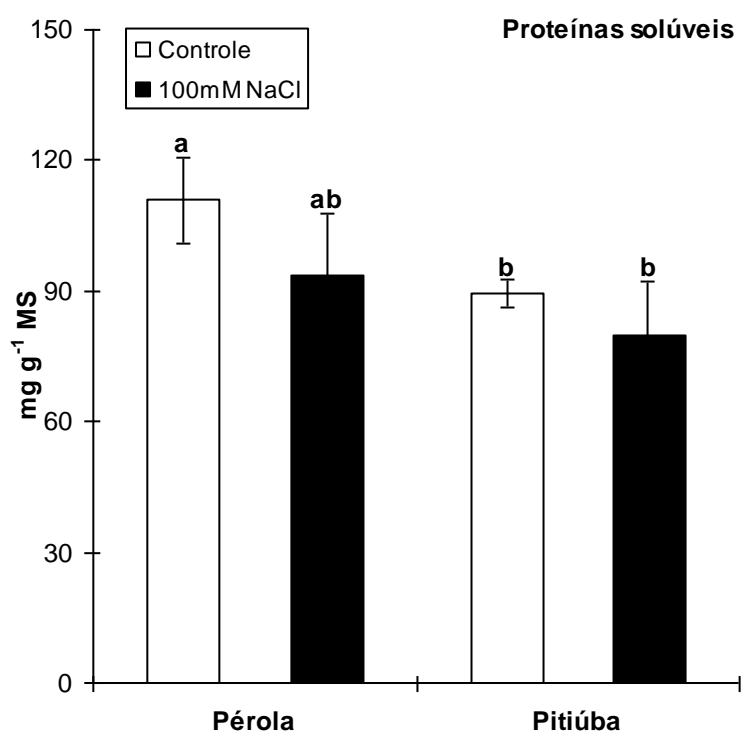


Figura 4: Teor de proteínas solúveis de folhas de feijão-caupi cv. Pérola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM (■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

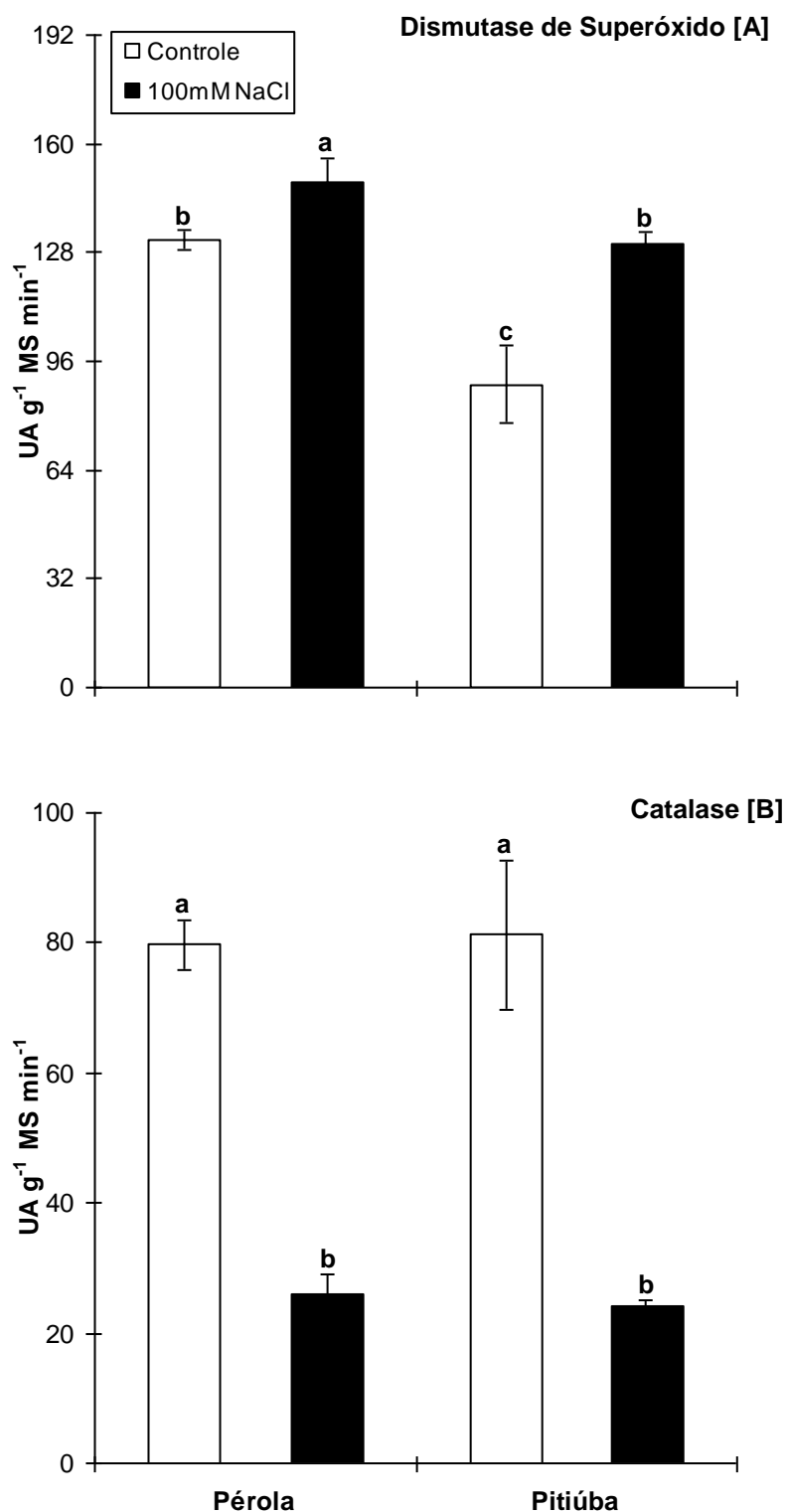


Figura 5: Atividade de enzimas dismutase de superóxido (SOD) [A] e catalase (CAT) de folhas de feijão-caupi cv. Pérola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM(■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

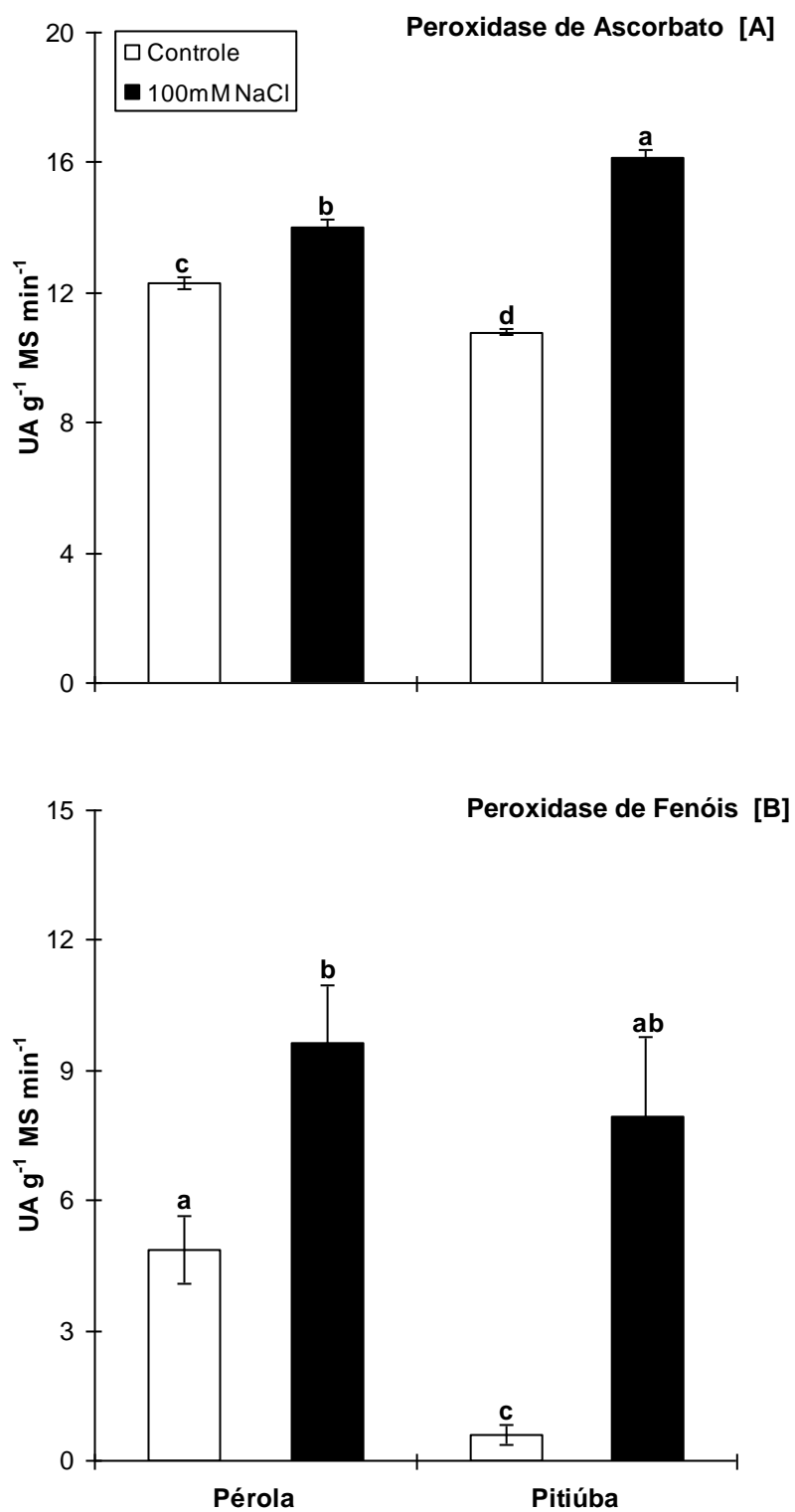


Figura 6: Atividade de enzimas peroxidase de ascorbato (APX) [A] e peroxidase de fenóis (POX) de folhas de feijão-caupi cv. Pérola (à esquerda) e Pitiúba (à direita) sob condição controle (□) e submetidas a tratamento salino com solução NaCl 100mM(■). Colunas com a mesma letra não diferiram significativamente (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Sob condições normais, a cv. Pérola apresentou atividade de POX 87% maior que a da cv. Pitiúba. Já nas folhas de plantas sob tratamento salino apresentaram um aumento de até 50% para a cv. Pérola, em atividade de POX, e de até 92% para a cv. Pitiúba.

É interessante observar que os níveis do controle da cv. Pérola foram maiores nas atividades SOD, APX e POX assim como no conteúdo de proteínas solúveis comparando-se com a cv. Pitiúba. Inversamente, essa última cultivar apresenta maior nível constitutivo de TBARS.

#### 4.4. DISCUSSÃO

Diversos trabalhos citam que, sob estresse salino, comumente é observada uma redução na taxa de crescimento relativo (TCR) e na produtividade de plantas. Esse efeito seria provavelmente ocasionado por distúrbios no funcionamento de componentes fotossintéticos como no fotossistema I, fotossistema II e Rubisco (Apse e Blumwald, 2002; Sivakumar *et al.* 1998; Kawasaki *et al.* 2001; Chen e Murata, 2002). Nesse experimento as plantas apresentaram redução na TCR, quando tratadas com NaCl 100mM, indicando que o tratamento salino influenciou na redução do crescimento de plântulas de feijão-caupi.

Segundo Greenway e Munns (1980), a redução na taxa de crescimento das plantas sob tratamento salino pode estar relacionada à toxicidade iônica, desbalanço nutricional ou uma combinação desses dois fatores. Além disso, o Na<sup>+</sup> também afeta diversos mecanismos metabólicos, através da indução de estresse osmótico e na indução de estresse oxidativo (Hasegawa *et al.* 2000). Em plantas de feijão-caupi tratadas com NaCl, um dos fenômenos observados é o fechamento rápido dos estômatos, proporcionando uma redução severa na acumulação de matéria seca, ocasionada pela restrição na assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (Souza *et al.*, 2004). Os indícios de fechamento estomático e os valores de C.R.A. observados sugerem que a diminuição na TCR pode estar relacionada a um déficit hídrico (efeito osmótico) nos tecidos foliares, induzido pelo tratamento com NaCl



(Cavalcanti *et al.* 2004). Adicionalmente, essa desidratação parcial poderia diminuir a taxa de crescimento relativo por uma diminuição subsequente da taxa fotossintética.

Vários autores mencionam que o estresse osmótico também pode causar danos severos à integridade de membranas em diversos tecidos de diferentes espécies vegetais (Dionísio-Sese e Tobita, 1998; Hernández *et al.*, 2001; Sudhakar *et al.*, 2001). A manutenção da integridade de membranas (avaliada pelo percentual de vazamento de eletrólitos) em níveis baixos é freqüentemente relacionada à tolerância da planta ao estresse salino e osmótico. A peroxidação de lipídios é outro indicador efetivo de danos oxidativos celulares. Um aumento na concentração de TBARS em plantas estressadas pode indicar extensa peroxidação de lipídios, em membranas celulares, causada por estresse oxidativo (Sairam *et al.*, 2002).

Segundo Ashraf e Harris (2004) inúmeras evidências indicam que a produção de EROs aumenta em resposta a diferentes estresses ambientais como o estresse salino. Plantas que apresentam concentração elevada de antioxidantes (tanto enzimáticos como não enzimáticos), demonstram resistência considerável a danos oxidativos causados por EROs. Assim, o aumento no percentual de vazamento de eletrólitos em plantas de feijão-caupi expostas a NaCl 100mM e o ligeiro aumento na peroxidação de lipídeos sugerem que o tratamento provocou uma diminuição na integridade de membranas. Contudo, os danos oxidativos, medidos pelo TBARS não estão relacionados ao vazamento de eletrólitos. De outra forma, o sistema antioxidante (tanto enzimático, como o não enzimático) das duas cultivares provavelmente respondeu eficientemente ao estresse oxidativo promovido pelo tratamento salino.

As plantas eliminam o excesso de EROs, provocado por estresses abióticos, através do aumento generalizado da atividade de diversas enzimas antioxidantes como SOD, APX, POX, CAT e GR (Jiang e Zhang, 2002; Patsikka *et al.* 2002; Vaidyanathan *et al.*, 2003). Esse comportamento foi observado em algodoeiro (*Gossypium herbaceum*) (Gosset *et al.* 1994), cevada (*Hordeum vulgare*) (Acar *et al.* 2001), tomateiro (*Lycopersicum esculentum*) (Shalata e Tal, 1998) e beterraba (*Beta vulgaris*) (Bor *et al.* 2003).

Dentre as enzimas estudadas o aumento na atividade de POX está diretamente relacionada à redução na taxa de crescimento de plântulas economicamente importantes, como o arroz (Dionísio-Sese e Tobita, 1998). Essa enzima participa da formação de hemiceluloses e insolubilização de glicoproteínas

ricas em hidroxiprolina, no ambiente apoplástico, causando endurecimento da parede celular (Dionísio-Sese e Tobita, 1998). Outros autores sugerem que o NaCl possa promover um aumento na atividade dessa enzima através da superexpressão de genes que codificam peroxidase (síntese *de novo*; Mittal e Dubey, 1991), ou por ativação de isoformas previamente sintetizadas (Gosset *et al.* 1994; Dionísio-Sese e Tobita, 1998, Sudhakar *et al.*, 2001; Lin e Kao, 2002).

Os resultados obtidos sugerem que a atividade de POX e a TCR de plantas de feijão-caupi estressadas com NaCl mostraram algum grau de correlação negativa, ou seja, quando a atividade de POX aumenta durante o tratamento salino, o TCR diminui. Nesse sentido, acredita-se que a POX possa estar envolvida muito mais com a redução na TCR de feijão-caupi, estressado com NaCl, do que na proteção dos tecidos contra danos oxidativos causados por EROs.

Em contraste à atividade de POX, a atividade de CAT foliar foi dramaticamente reduzida (75%) em plantas tratadas. Uma redução na atividade de CAT indica que o estresse osmótico induzido pelo NaCl, de alguma forma, causa efeitos estruturais ou funcionais diretos na proteína CAT. Foyer e Noctor (2000) sugerem que o estresse salino pode provocar a degradação de CAT por proteases endógenas. Por outro lado, a inibição da atividade de CAT é um fenômeno que ocorre em muitas espécies vegetais expostas ao estresse oxidativo, e possivelmente está relacionada à acumulação de ácido salicílico (Shim *et al.*, 2003).

Palatnik *et al.* (2002) estudando a atividade de enzimas antioxidantes em plantas mutantes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) deficientes em catalase, identificaram que a interação entre APX e CAT, também observada por Mazza *et al.* (1999), revela que esse sistema antioxidante encontra um novo equilíbrio no ambiente celular de mutantes deficientes de catalase. Nesse cenário, o aumento na atividade de APX pode fornecer ao mutante uma via alternativa para eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando os níveis de CAT são criticamente baixos para a sobrevivência das plantas. Baseado nessas observações fica claro que o equilíbrio entre as atividades de CAT e APX exibe uma forte e complexa interação em células vegetais (Palatnik *et al.*, 2002).

Nos resultados apresentados, a atividade de SOD e APX se apresentaram de maneira semelhante. As reduções drásticas na atividade de CAT e o aumento da atividade de POX e APX indicam que, dentre as enzimas estudadas, as peroxidases participam ativamente da via de eliminação de EROs, quando a atividade de CAT é

reduzida. Contudo, o aumento na atividade de SOD, em folhas de feijão-caupi, sugere que a atividade de remoção de EROs está principalmente localizada em ambiente intracelular, o que é justificado por uma concentração de isoformas de SOD nesse compartimento (Sudhakar *et al.*, 2001).

Assim, o discreto aumento nos danos oxidativos observado em folhas de plantas de feijão-caupi tratadas com NaCl 100mM e medidos por TBARS, podem estar relacionados à resposta do sistema antioxidante enzimático das folhas. Acredita-se, portanto, que essas cultivares apresentem mecanismos diferenciados para a eliminação de EROs através do sistema SOD-APX-CAT. O cv. Pérola apresenta níveis basais altos de atividade dessas enzimas, o que possibilita a concentração baixa de TBARS nessa cultivar. Já a cv. Pitiúba apresenta um nível basal de peroxidação de lipídeos ligeiramente maior do que a cv. Pérola, o que pode estar relacionado à menor atividade do sistema SOD-APX-CAT nessa cultivar, sob condição controle.

De outro modo, evidencia-se propõe-se que a cv. Pitiúba apresenta um mecanismo de defesa frente ao estresse osmótico (ocasionado por salinidade), através do aumento do potencial hídrico foliar, o que pode ocorrer por um extravasamento maior do conteúdo celular (evidenciado pelo maior nível de extravasamento de eletrólitos) e o enrijecimento precoce dos tecidos foliares através do aumento da atividade de POX. Assim, na cv Pitiúba, as atividades dessas enzimas antioxidantes, apresentam-se com um nível basal inferior ao da cv. Pérola, dado a necessidade de utilizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como um sinalizador celular.

#### **4.5. CONCLUSÃO**

Os danos causados pelo tratamento salino parecem não estar relacionados ao estresse oxidativo.

O índice de TBARS, juntamente com a atividade total de SOD, CAT, APX e POX, não mostraram ser bons indicadores fisiológicos, para explicar a intensidade dos danos oxidativos causados por NaCl em folhas de plantas de feijão-caupi.

A capacidade de folhas de feijão-caupi em resistir a estresse oxidativo, causado por salinidade, parece envolver diferentes vias de remoção de EROs.

#### 4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAR, O.; TÜRKAN, I.; ÖZDEMİR, F. Superoxide dismutase and peroxidase activities in drought sensitive and resistant barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, **Acta Physiologiae Plantarum**, v.233, p. 351–356, 2001.
- APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.146-150, 2002.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants, **Plant Science**, v.166, p.3-16, 2004.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, p.276-287, 1971.
- BLUM A.; EBERCON, A. Cell Membrane Stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. **Crop Science**, v.21, p.43-47, 1981.
- BOR, M.; OZDENIR, F.; TÜRKAN, Í. The effect of salt tress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L., **Plant Science**, v. 164, p. 77-84, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.722, p.248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNPV/CLAV, 1992. 365p.
- CAIRO, P. A. R. Relações hídricas de plantas. Vitória da Conquista: UESB, 1995. 32p.
- CAVALCANTI, F. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v. 163, p.563-571. 2004.
- CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p.250-257, 2002.
- DIONISIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, v.135, p.1–9, 1998.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. Tansley Review 112, **New Phytologist**, v.146, p 359–388, 2000.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 3, p. 355-364, 2003.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

GOSSET, D. R.; MILLHOLLON, E. P.; LUCAS, M. C. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. **Crop Science**, v. 34, p.706-714, 1994.

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

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.

HAVIR, F. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiples form of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation, **Archive of Biochemistry and Biophysics**, v.125, n.1, p.189-198, 1968.

HERNÁNDEZ, J. A.; ALMANSA, M. S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.251–257, 2002.

HERNÁNDEZ, J.A.; FERRER, M.A.; JIMÉNEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and  $O_2^-$   $\square$ /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, v.127, p.817–831, 2001.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. J. The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, 1950. 32p.

JIANG, M.; ZHANG, J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves, **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p.2401-2410, 2002.

JUNG, S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. **Plant Science**, v.166, p. 459–466, 2004.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence, **Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; GALBRAITH, D.; BOHNERT, H. J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **Plant Cell**, v. 13, p.889-905, 2001.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*), **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.713-721, 1993.

LIN, C.L.; KAO, C.H. Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.37, p.177–184, 2002.

MAZZA, C. A.; BATTISTA, D.; ZIMA, A. M.; SZWARCBERG-BRACCHITTA, M.; GIORDANO, C. V.; ACEVEDO, A.; SCOPEL, A. L.; BALLARE, C. L. The effects of solar ultraviolet-B radiation on the growth and yield of barley are accompanied by increased DNA damage and antioxidant responses. **Plant and Cell Environment**, v. 22, p.61-70, 1999.

MITTAL, R.; DUBEY, R. S. Behavior of peroxidases in rice: changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. **Plant Physiology Biochemistry**, v.29, p.31–40, 1991.

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

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, **Plant Cell Physiology**, v.22, p.1068-1072, 1981.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.249–279, 1998.

PALATNIK J. F.; VALLE, E. M.; FEDERICO, M. L.; GÓMEZ, L. D.; MELCHIORRE, M. N.; PALEO, A. D.; CARRILLO, N.; ACEVEDO, A. Status of antioxidant metabolites and enzymes in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, v. 162, p.363-371, 2002.

PATSIKKA, E.; KAIRAVUO, M.; SERSEN, F.; ARO, E. M.; TYYSTJARVI, E. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. **Plant Physiology**, v.129, p.1359-1367, 2002.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MSQUIM, R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effect on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p.137-143, 1999.

SAIRAM, R. K.; RAO, K. V.; SRIVASTAVA, G. C. Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, v.163, p.1037–1046, 2002.

SHALATA, A.; TAL, M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidant in the of the cultivated tomato an its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*, **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 169-174, 1998.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y. ; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1305–1319, 2002.

SHIM, I.; MOMOSE, Y.; Yamamoto, A.; KIM, D.; USUI, K. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationships to salicylic acid accumulation in plants, **Plant Growth Regulation**, v. 39, p.285–292, 2003.

SILVEIRA, J. A. G.; COSTA, R. C. L.; VIÉGAS, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; FIGUEREDO, M. V. B. N-compound accumulation and carbohydrate shortage on N<sub>2</sub> fixation in drought-stressed and rewatered cowpea plants. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.1, p.231–239, 2003.

SIVAKUMAR, P.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. P. Proline suppresses Rubisco activity in higher plants, **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 252, p.428-432, 1998.

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGÔA, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.45–56, 2004.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v.161, p.613–619, 2001.

VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARTY, R.; THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) – differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v.165, p.1411–1418, 2003.

ZHENG, X.; VAN HUYSTEE, R. B. Peroxidase-regulated elongation of segments from peanut hypocotyls. **Plant Science**, v.81, p.47–56, 1992.

## **5. CONCLUSÃO FINAL**

As cultivares de caupi estudadas apresentaram respostas fisiológicas contrastantes ao tratamento salino especialmente durante a germinação, caracterizando a cultivar Pérola como sensível e a cultivar Pitiúba como resistente.