

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

CARLOS EDUARDO BRAGA DE ABREU

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM PLÂNTULAS DE
CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE SUBMETIDAS À SALINIDADE EM DUAS
CONDIÇÕES DE CULTIVO**

FORTALEZA - CE

- 2007 -

CARLOS EDUARDO BRAGA DE ABREU

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM PLÂNTULAS DE
CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE SUBMETIDAS À SALINIDADE EM DUAS
CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

**ORIENTADOR:
ENÉAS GOMES FILHO**

FORTALEZA – CE

- 2007 -

Esta Dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho dessa Dissertação é permitida desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Carlos Eduardo Braga de Abreu

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 03 / 04 / 2007

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. José Tarquinio Prisco
(Universidade Federal do Ceará)

Dr. Marlos Alves Bezerra
(EMBRAPA-CNPAT)

FORTALEZA - CE

- 2007 -

“Eu peço que esta obra seja lida com indulgência e que os erros inevitáveis em matéria tão difícil sejam menos assunto de recriminação do que oportunidade para novas tentativas e pesquisas mais felizes”.

Isaac Newton

*Ao meu pai, **Waldemi**, à minha
mãe, **Ivoneide**, e à minha irmã,
Lívia.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, *Waldemi Procópio de Abreu e Maria Ivoneide Braga de Abreu*, a quem dedico este trabalho, pela abnegação, apoio e compreensão a mim oferecidos, um agradecimento todo especial;

Aos professores *Enéas Gomes Filho e José Tarquínio Prisco*, pela confiança depositada, orientação, apoio e incentivo para a minha formação científica;

À *Marlos Alves Bezerra*, pelas críticas e sugestões e por aceitar participar de minha banca examinadora;

Ao meu primo *João Paulo Braga Cavalcante*, pelo grande apoio e pela confiança depositada em mim;

À minha amiga e namorada *Thalita Montoril Ferreira*, a quem dedico este trabalho, pelo apoio, carinho e compreensão despendidos comigo, um agradecimento todo especial;

Aos amigos e colegas do grupo de Fisiologia Vegetal: *Alexcyane Rodrigues Feijão, Ana Raquel Cardoso Nogueira, Elton Camelo Marques, Fabrício Bonfim Sudério, Franklin Aragão Gondim, Gislainy Karla da Costa Barbosa, Prof. Joaquim Enéas Filho, Juan Carlos Alvarez Pizarro, Michella Albuquerque Lima, Nara Lídia Mendes Alencar, Sidney Carlos Praxedes e Valdinéia Soares* que me ajudaram direta ou indiretamente no decorrer deste trabalho;

Aos professores e colegas do curso de Mestrado em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará;

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

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

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS E TABELA	12
1- INTRODUÇÃO	16
1.1- Caracterização do problema	16
1.2- Objetivos	19
2- REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1- Aspectos gerais do estresse salino	20
2.2- Salinidade e crescimento	21
2.3- Salinidade e fotossíntese	23
2.4- Salinidade e o ajustamento osmótico	25
2.5- Salinidade e solutos inorgânicos	27
2.6- Salinidade e solutos orgânicos	31
2.7- Salinidade e estresse oxidativo	34
2.8- Aclimatação e adaptação das plantas ao estresse salino	36
2.9- Salinidade e o estudo da expressão gênica de plantas	38
3- MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1- Semeadura e condições de cultivo	42
3.2- Medidas de crescimento	44
3.3- Parâmetros fotossintéticos e eficiência no uso da água	45
3.4- Determinação de clorofila	45
3.5- Potencial osmótico foliar	46
3.6- Determinação dos teores de solutos inorgânicos	46
3.7- Determinação dos teores de solutos orgânicos	47
3.7.1- Concentração de prolina livre	47
3.7.2- Concentração de carboidratos solúveis	48

3.7.3- Concentração de N-aminossolúveis	48
3.8- Extração das proteínas e obtenção dos padrões eletroforéticos bidimensionais	49
3.8.1- Análises dos padrões protéicos	53
3.9- Delineamento experimental e análise estatística	53
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1- Crescimento vegetativo	54
4.2- Trocas gasosas	60
4.3- Conteúdo de clorofila	66
4.4- Potencial osmótico	72
4.5- Solutos inorgânicos	75
4.5.1- Teores de sódio e cloreto	75
4.5.2- Teores de potássio	80
4.5.3- Relação Na^+/K^+	82
4.6- Solutos orgânicos	85
4.6.1- Prolina	85
4.6.2- Carboidratos	87
4.6.3- N-aminossolúveis	90
4.7- Comparação dos padrões eletroforéticos bidimensionais	92
5. CONCLUSÕES	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

RESUMO

ABREU, C.E.B. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em plântulas de cajueiro anão-precoce submetidas à salinidade em duas condições de cultivo.** Fortaleza: UFC. 126 p. (Dissertação)

O presente trabalho teve por objetivo estudar as respostas fisiológicas e bioquímicas de plântulas de cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.) à salinidade em duas condições ambientais de cultivo. Para isso, as plântulas foram cultivadas em vasos de polietileno contendo somente solução nutritiva (tratamento controle) ou solução nutritiva com NaCl a 50, 100, 150 e 200 mM (tratamentos salinos), sendo mantidas em duas condições ambientais: casa de vegetação e sala de germinação. Os efeitos do estresse salino foram avaliados através de medidas de crescimento, trocas gasosas, teores de clorofila, potencial osmótico foliar e teores de solutos orgânicos (prolina, N-aminossolúveis e carboidratos solúveis) e inorgânicos (Na^+ , Cl^- e K^+) nas folhas e raízes. Também foram estudadas as alterações na expressão gênica com a salinidade, o que foi feito através da comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de folhas e raízes. A salinidade reduziu o crescimento das plântulas em ambas as condições ambientais de cultivo, sendo que nas plântulas da casa de vegetação, a inibição do crescimento foi mais acentuada do que naquelas da sala de germinação. Este fato correlacionou-se com as maiores reduções na fotossíntese líquida, na transpiração e na condutância estomática das plântulas da casa de vegetação em relação às da sala de germinação. Nas duas condições de cultivo, os efeitos inibitórios do NaCl foram mais conspícuos nas raízes do que na parte aérea. A salinidade não causou grandes mudanças nas concentrações internas de CO_2 das plântulas de cajueiro, sugerindo a participação de fatores não-estomáticos na inibição das taxas fotossintéticas. Os teores foliares de clorofila *a*, *b* e *total* foram influenciados pela salinidade e pelas condições de cultivo das plântulas, sendo que as da sala de germinação apresentaram os maiores conteúdos e as menores reduções desses pigmentos devido à salinidade. As leituras feitas com o medidor portátil de clorofila, SPAD-502, correlacionaram-se positivamente com os teores foliares de clorofila, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, tanto nas plântulas da casa de vegetação quanto nas da sala de germinação. As maiores reduções no potencial osmótico e os maiores acúmulos de Na^+ e Cl^- nas folhas pela salinidade, em relação ao controle, foram observados nas plântulas da casa de vegetação. Por outro lado, os teores de K^+ nesse órgão não diferiram muito entre as duas condições de cultivo empregadas. As raízes acumularam grandes quantidades de Na^+ e Cl^- em

seus tecidos, as quais foram acompanhadas de grandes decréscimos nos teores de K^+ , em ambas as condições de cultivo. Com o aumento da salinidade, os teores de prolina foram aumentados, principalmente nas folhas, sendo os maiores incrementos observados nas plântulas da casa de vegetação. Os teores de carboidratos solúveis foram aumentados e reduzidos, devido à salinidade, somente nas folhas das plântulas da sala de germinação e nas raízes das plântulas da casa de vegetação, respectivamente. Nas duas condições de cultivo, a salinidade aumentou os teores de N-aminossolúveis nas folhas e nas raízes das plântulas de cajueiro. O padrão de expressão gênica das folhas e das raízes foi alterado pelo estresse salino em ambas as condições ambientais. A salinidade causou aumentos e diminuições nas taxas de expressão de várias proteínas, sendo que algumas desapareceram completamente e outras foram aparentemente sintetizadas *de novo* nas plântulas estressadas. As proteínas diferencialmente reguladas pelo estresse salino foram bastante diferentes nas duas condições ambientais empregadas. Faz-se necessário o seqüenciamento e a identificação dessas proteínas para que se possa especular sobre seus possíveis papéis no processo de aclimatação das plântulas de cajueiro às condições de salinidade.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*, cajueiro anão-precoce, clorofila, crescimento, eletroforese 2D, estresse salino, expressão de proteínas, potencial osmótico, solutos orgânicos e inorgânicos e trocas gasosas.

ABSTRACT

ABREU, C.E.B. **Physiological and biochemical changes in early-dwarf cashew seedlings subjected to salinity in two cultivation conditions.** Fortaleza: UFC. 126 p. (M. S. Dissertation)

Early-dwarf cashew seedlings (*Anacardium occidentale* L.) were used in order to investigate the physiological and biochemical changes induced by salt stress in two environmental conditions. The seedlings were cultivated in plastics pots containing only nutrient solution (control treatment) or nutrient solution with NaCl at 50, 100, 150 and 200 mM (saline treatment). They were kept in two environmental conditions: greenhouse and growth room. The effects of salinity on the growth, gas exchange, chlorophyll content, osmotic potential and organic (proline, soluble amino-N, soluble carbohydrates) and inorganic (Na^+ , Cl^- , K^+) solute contents from both leaves and roots were studied. Salt stress induced changes in gene expression were studied both in leaves and roots comparing 2D electrophoretic pattern. Salinity inhibited the growth of seedlings in both environmental conditions, being the reduction in seedlings growth in the greenhouse more conspicuous than those cultivated in the growth room. This fact was correlated with highest reductions in net photosynthetic rate, in transpiration and stomatal conductance of seedlings grown in the greenhouse when compared with those of growth room. In both cultivation conditions, the root growth was affected by NaCl than shoot growth. The salinity stress not caused great changes in CO_2 internal concentration, suggesting that the inhibition of photosynthesis also may be attributed to non-stomatal factors. Leaf chlorophyll *a*, *b* and *total* contents were influenced by salinity and environmental conditions, being observed the highest contents and the lowest reductions of these pigments due to salinity in seedlings under growth room conditions. The readings of portable chlorophyll meter, SPAD-502, were positively correlated to leaf chlorophyll contents, expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, both in greenhouse and growth room conditions. In the salt stress conditions, the higher reductions of osmotic potential and higher Na^+ and Cl^- accumulations in leaves were observed in seedlings grown in the greenhouse. On the other hand, leaves K^+ contents did not differ much among the cultivation conditions used. The roots accumulated greater amounts of Na^+ and Cl^- in their tissues, which were accompanied of great decreases in the K^+ contents in both cultivation conditions. Proline content increased with the increase in salt stress especially in leaves, being the greater increases observed in seedlings cultivated in the greenhouse. The soluble carbohydrates

contents were increased and decreased, due to salinity, only in leaves of seedlings of growth room and roots of those grown in the greenhouse, respectively. In both cultivation conditions, salinity increased the leaf and root soluble amino-N contents of cashew seedlings. The gene expression patterns both leaves and roots were altered by salt stress, in both environmental conditions. Salinity induced increases and decreases in expression of various proteins, being that some proteins disappeared completely and other were apparently synthesized *de novo* in the seedlings stressed. The proteins differentially regulated by salt stress were enough different among the environmental conditions used. Future studies should be focused on sequencing and identification of proteins whose rate of synthesis varied as a result of salinity, in order to better characterize their possible roles in the process of acclimation of cashew seedlings to salinity conditions.

Keywords: *Anacardium occidentale*, chlorophyll, early-dwarf cashew, 2D-electrophoresis, gas exchange, growth, organic and inorganic solute, osmotic potential, protein expression and salinity stress.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

- Figura 1.** Plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas sob condições de casa de vegetação e de sala de germinação no dia da transferência para os meios hidropônicos 43
- Figura 2.** Fluxograma da extração e obtenção das proteínas de folhas e de raízes das plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06 50
- Figura 3.** Matérias secas da parte aérea, das raízes e das plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 55
- Figura 4.** Relação de matéria seca da parte aérea pela das raízes (MSPA/MSR) e área foliar de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 58
- Figura 5.** Fotossíntese líquida, condutância estomática, taxa de transpiração e relação entre a concentração de CO₂ interna e externa (C_i/C_e) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 61
- Figura 6.** Eficiência no uso da água em plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 65
- Figura 7.** Teores foliares de clorofilas *a*, *b*, *total* e relação clorofila *a* / clorofila *b* de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 67

- Figura 8.** Teores relativos de clorofila, medidas com o medidor portátil de clorofila (SPAD-502), de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 70
- Figura 9.** Correlação entre as leituras feitas com o SPAD-502 e os teores foliares de clorofila *total*, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 71
- Figura 10.** Sintomas de clorose e de zonas necróticas nas folhas das plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em casa de vegetação 73
- Figura 11.** Potencial osmótico foliar de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 74
- Figura 12.** Teores de sódio nas folhas e nas raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 76
- Figura 13.** Teores de cloreto nas folhas e nas raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 78
- Figura 14.** Teores de potássio nas folhas e nas raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação 81
- Figura 15.** Relação entre os teores de sódio e de potássio nas folhas e nas raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis

crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação	83
Figura 16. Teores de prolina nas folhas e nas raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação	86
Figura 17. Teores de carboidratos solúveis nas folhas e nas raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação	88
Figura 18. Teores de N-aminossolúveis nas folhas e nas raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação e de sala de germinação	91
Figura 19. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de folhas de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em casa de vegetação, sob condições controle e de estresse salino	93
Figura 20. Principais alterações nos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de folhas de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em casa de vegetação, sob condições controle e de estresse salino	94
Figura 21. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de folhas de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em sala de germinação, sob condições controle e de estresse salino	95
Figura 22. Principais alterações nos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de folhas de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em sala de germinação, sob condições controle e de estresse salino	96

Figura 23. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em casa de vegetação, sob condições controle e de estresse salino	98
Figura 24. Principais alterações nos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em casa de vegetação, sob condições controle e de estresse salino	99
Figura 25. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em sala de germinação, sob condições controle e de estresse salino	100
Figura 26. Principais alterações nos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em sala de germinação, sob condições controle e de estresse salino	101
Tabela 1. Composição do gel utilizado na eletroforese (SDS-PAGE)	52

1- INTRODUÇÃO

1.1- Caracterização do problema

Em condições naturais e agricultáveis, as plantas estão freqüentemente expostas a estresses ambientais, tanto bióticos como abióticos (ASHRAF & HARRIS, 2005). Dentre os estresses abióticos sofridos pelas plantas, destaca-se a salinidade, que diz respeito à presença em quantidades excessivas de sais solúveis na solução do solo, os quais interferem negativamente no rendimento das culturas, podendo causar prejuízos econômicos (BOYER, 1982). Estimativas da FAO (*Food and Agriculture Organization*) indicam que dos 230 milhões de hectares irrigados no globo terrestre, cerca de 45 milhões (19,5%) estão afetados pelo excesso de sais, o que acarreta sérios prejuízos para a produção agrícola (FAO, 2005). Tal problema se torna ainda mais relevante nas regiões áridas e semi-áridas, as quais são caracterizadas por apresentarem elevadas taxas evapotranspiratórias e baixas precipitações pluviométricas (ASHRAF & HARRIS, 2005). Associado às condições climáticas desfavoráveis, o processo de salinização tem sido favorecido pelas práticas de manejo inadequadas do solo e da água e pelo uso de água de irrigação de baixa qualidade.

As estimativas indicam que mais de 100 países vêm enfrentando problemas com a salinidade em extensão e natureza variadas (RENGASAMY, 2006), os quais causam a deterioração de 2 milhões de hectares de solos agricultáveis anualmente (SZABOLCS, 1994). No Brasil, esse problema ocorre especialmente na região Nordeste, onde um levantamento feito pelo DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra a Seca) mostrou que 20% das áreas agricultáveis sob sua jurisdição apresentavam problemas de salinidade, sendo que 12% delas já haviam sido desativadas (GHEYI, 2000). Esse processo acelerado de salinização torna-se ainda mais preocupante face às projeções futuras de aumento da população e da demanda por alimentos (OWENS, 2001). A agricultura moderna, por conseguinte, enfrenta

um paradoxo sem precedentes, o de produzir mais alimentos numa área agricultável cada vez menor.

O Laboratório de Salinidade dos Estados Unidos classifica os solos quanto à salinidade, levando em consideração a medida da condutividade elétrica (CE) de seu extrato de saturação. De acordo com essa classificação, solos salinos são aqueles que apresentam CE do extrato de saturação superior a 4 dS.m^{-1} (RICHARDS, 1954). Os solos salinos, também, são caracterizados por apresentarem percentagem de sódio trocável inferior a 15 e pH, geralmente, menor do que 8,5. Os principais íons acumulados nesses solos são os cátions Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ e os ânions Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- e HCO_3^- (OLIVEIRA, 1997).

Tendo em vista os elevados custos envolvidos com a recuperação dos solos salinos, uma alternativa viável para minorar ou resolver o problema da salinidade sobre a produção agrícola, seria o melhoramento genético (via engenharia genética ou cruzamentos seguidos de seleção) de espécies cultivadas, visando aumentar a tolerância das plantas ao estresse salino (HOLMBERG & BÜLOW, 1998; OWENS, 2001; RUIZ, 2001; FLOWERS, 2004). No entanto, são escassos os exemplos concretos de obtenção de plantas tolerantes à salinidade via melhoramento genético tradicional ou através da produção de transgênicos (APSE *et al.*, 1999; ZHANG & BLUMWALD, 2001; APSE & BLUMWALD, 2002). Entre os fatores que contribuem para tal dificuldade, podem ser citados: a natureza multigênica das respostas ao estresse salino (VINOCUR & ALTMAN, 2005), as extrapolações indevidas de resultados obtidos em laboratório para as condições de campo (MITTLER, 2006) e, principalmente, a falta de conhecimentos detalhados dos diversos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos com a tolerância à salinidade (SAIRAM & TYAGI, 2004; YAMAGUCHI & BLUMWALD, 2005).

Dentre as espécies frutíferas cultivadas no Nordeste brasileiro, destaca-se o cajueiro, com mais de 690.000 hectares plantados. A cajucultura é uma das principais atividades sócio-

econômicas da região Nordeste do Brasil, sendo responsável por mais de 98% da produção nacional de castanha, sendo os Estados do Ceará (43,9%), Rio Grande do Norte (27,6%) e Piauí (16,2%) os maiores produtores (IBGE, 2005). Contudo, a cajucultura cearense vem atravessando um período crítico, causado pelos constantes declínios de produtividade. Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a produtividade em castanhas de caju do Estado do Ceará, no ano de 2003, foi de 296 kg.ha⁻¹, porém nos dois anos seguintes ela foi significativamente reduzida, apresentando no ano de 2005 uma produtividade de 179 kg.ha⁻¹, portanto uma queda na produtividade de 39,5%.

A cultura do cajueiro é, em sua grande maioria, cultivada sob condições de sequeiro. Entretanto, nos últimos anos, a propagação vegetativa de novos materiais de cajueiro e o desenvolvimento da tecnologia de irrigação localizada levaram alguns produtores a implantarem novos plantios com cajueiros enxertados e cultivados sob irrigação, os quais vêm se mostrando bastante promissores (CAVALCANTI JUNIOR & CHAVES, 2001). Infelizmente, a natureza do trópico semi-árido e o manejo inadequado do solo e da água na agricultura irrigada podem resultar, a médio ou longo prazo, em problemas de salinidade do solo e, dessa forma, comprometer a produtividade.

Diante do exposto, estudos visando o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos responsáveis pela adaptação e aclimatação do cajueiro anão-precoce às condições de salinidade são fundamentais. Esses conhecimentos poderão fornecer subsídios, não só para o desenvolvimento de novas técnicas de manejo da cultura sob condições de salinidade como também auxiliar os biólogos moleculares e geneticistas que trabalham no desenvolvimento de novos cultivares que sejam mais tolerantes à salinidade.

1.2- Objetivos

Pretende-se caracterizar as respostas fisiológicas e bioquímicas das plântulas de cajueiro anão-precoce à salinidade em duas condições ambientais de cultivo: casa de vegetação e sala de germinação. Tais respostas serão analisadas em termos de possíveis alterações no crescimento, nas trocas gasosas, nos teores de clorofila, no potencial osmótico foliar, nos teores de solutos orgânicos e inorgânicos em folhas e raízes. Além disso, pretende-se analisar os efeitos do estresse salino na expressão das proteínas de folhas e raízes, através da comparação de seus padrões eletroforéticos bidimensionais.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Aspectos gerais do estresse salino

As plantas, quando em ambientes salinos, experimentam uma série de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que dependem de vários processos moleculares (HASEGAWA *et al.*, 2000; XIONG & ZHU, 2002). Estas alterações induzidas pelo estresse salino são conseqüências de efeitos osmóticos e iônicos. O componente osmótico resulta das elevadas concentrações de sais na solução do solo, os quais reduzem o potencial osmótico dessa solução, diminuindo, conseqüentemente, a disponibilidade de água para a planta. Já os efeitos iônicos resultam da absorção de íons pelas plantas, os quais podem causar toxicidade, desequilíbrios nutricionais ou ambos (GREENWAY & MUNNS, 1980; MUNNS & TERMAAT, 1986). Os desequilíbrios osmótico e iônico gerados pelo estresse salino reduzem o crescimento das plantas através de alterações em diferentes processos, tais como, fotossíntese, condutância estomática, respiração, metabolismo dos lipídios, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - do Inglês, *reactive oxygen species*) e síntese de proteínas (BETHKE & DREW, 1992; ZHU, 2001; TAIZ & ZEIGER, 2004; PARIDA & DAS, 2005). Entretanto, o grau com que o estresse salino afeta o crescimento das plantas depende de fatores intrínsecos da planta (genótipo e estágio de desenvolvimento), de fatores relacionados com o estresse (composição salina do meio, intensidade, duração e forma de aplicação do estresse) e de fatores ambientais (luz, temperatura e umidade relativa do ar), bem como depende da interação entre eles (BRAY *et al.*, 2000).

Enquanto algumas espécies apresentam elevadas tolerâncias à salinidade, outras são altamente susceptíveis. As plantas tolerantes a elevadas concentrações salinas são classificadas como halófitas, estas crescem rápido ou lentamente em concentrações de NaCl de 200 a 300 mM e chegam a tolerar concentrações deste sal de até 700 mM. As halófitas

desenvolveram ao longo da evolução mecanismos fisiológicos que as tornaram capazes de enfrentar o excesso de sais presentes na solução do solo. As glicófitas, por sua vez, apresentam menor tolerância à salinidade e seus crescimentos são inibidos em cerca de 25% em concentrações de NaCl abaixo de 100 mM, enquanto que entre 100 e 200 mM de NaCl somente as mais tolerantes conseguem crescer, embora que lentamente (GREENWAY & MUNNS, 1980; PARDO & QUINTERO, 2002). Vale salientar que, com algumas poucas exceções, como o coqueiro e a tamareira, as espécies cultivadas, em sua maioria, são pouco tolerantes à salinidade.

O fato da existência de plantas tolerantes à salinidade (halófitas), bem como a comprovada variabilidade no grau de tolerância intra e interespecífica em plantas sensíveis (glicófitas), são evidências que sugerem a existência de fatores genéticos que influenciam a tolerância aos sais (GREENWAY & MUNNS, 1980; YAMAGUCHI & BLUMWALD, 2005).

2.2 - Salinidade e crescimento

A redução do crescimento das plantas cultivadas em ambientes salinos tem sido citada na literatura há várias décadas (FLOWERS *et al.*, 1977; MUNNS & TERMAAT, 1986; NEUMANN, 1997; ZHU, 2002), sendo observada tanto em halófitas quanto em glicófitas.

Uma hipótese para explicar a inibição do crescimento das plantas pela salinidade, formulada por Munns & Termaat (1986), sugere que a inibição do crescimento caracteriza-se por ser uma resposta bifásica, na qual a diminuição do potencial osmótico seria o primeiro fator de redução do crescimento e o efeito específico dos íons, o segundo (MUNNS, 1993; MUNNS, 2002). Dessa forma, durante a primeira fase, a redução do crescimento vegetal seria devido aos efeitos osmóticos dos sais presentes no meio externo (estresse hídrico). A segunda fase, então, seria devido ao acúmulo de níveis excessivos de sais nas folhas, excedendo a

habilidade das células para compartimentalizar os sais no vacúolo. Conseqüentemente, a concentração de sais no citoplasma aumenta e inibe a atividade de enzimas de várias rotas metabólicas (MUNNS, 2005). Alternativamente, os sais podem ser transportados para as paredes celulares o que resulta, por sua vez, na desidratação das células (MUHLING & LAUCHLI, 2002). Esta segunda fase é a que separa claramente espécies e genótipos que diferem na habilidade de tolerar a salinidade (MUNNS, 2002).

Muitos autores afirmam que a limitação na disponibilidade de água, em situações de estresse salino, exerce seus efeitos diretamente na expansão e divisão celulares (ZIDAN *et al.*, 1990; NONAMI & BOYER, 1993). Um dos efeitos imediatos da salinidade sobre o crescimento das plantas é a redução da área foliar disponível para a fotossíntese, a qual pode resultar em perda de biomassa dos órgãos da planta (PARIDA & DAS, 2005). Decréscimos na produção de biomassa da parte aérea e das raízes foram observados em várias espécies, incluindo: pimenta (CHARTZOULAKIS & KLAPAKI, 2000), beterraba (GHOULAM *et al.*, 2002), banana (NEVES *et al.*, 2002), feijão-de-corda (COSTA *et al.*, 2003), milho (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004) e soja (KAO *et al.*, 2006). De acordo com alguns autores, o crescimento da parte aérea é geralmente mais afetado que o do sistema radicular, sendo observada uma redução na razão de massa seca entre a parte aérea e a raiz (CHEESEMAN, 1988; MUNNS, 2002). Outro fator que também pode contribuir para a diminuição da biomassa em condições de estresse salino é o redirecionamento do fluxo de carbono para processos que não estão envolvidos no crescimento, como por exemplo, aqueles relacionados com o ajustamento osmótico das plantas cultivadas em ambientes salinos (BINZEL *et al.*, 1985).

2.3- Salinidade e fotossíntese

O crescimento vegetal é geralmente descrito pela produção de biomassa, a qual está relacionada com a conversão de energia luminosa em energia química através do processo de fotossíntese (TAIZ & ZEIGER, 2004). Desse modo, o balanço de carbono é influenciado pela fotossíntese que, por sua vez, depende de fatores intrínsecos da planta (idade, presença de drenos fortes, fotorrespiração e conteúdo de clorofila) e fatores ambientais (intensidade de radiação, temperatura, umidade relativa do ar e disponibilidade de água e nutrientes). Portanto, estresses ambientais que causam reduções no crescimento também afetam a fotossíntese (SERRANO *et al.*, 1995; ANGELOCCI, 2002).

A redução no crescimento das plantas é muitas vezes acompanhada pelo decréscimo na taxa de fotossíntese, o qual tem sido bastante investigado (SOUSSI *et al.*, 1998; ROMERO-ARANDA *et al.*, 2001; AZEVEDO NETO *et al.*, 2004). Apesar disso, nenhum padrão claro surgiu para explicar os efeitos deletérios do sal sobre esse processo. Sob condições de salinidade, a taxa de fotossíntese pode ser limitada por fatores estomáticos e não-estomáticos (CHEESEMAN, 1988). Contudo, acredita-se que a maior porção da limitação na fotossíntese seja consequência direta do fechamento dos estômatos, os quais respondem à redução do potencial hídrico do solo causada pelos sais (DAVIES & ZHANG, 1991). A redução no grau de abertura estomática, que ocorre nas plantas estressadas, limita a absorção de CO₂ do ambiente e o fluxo de água e íons para a parte aérea (ROMERO-ARANDA *et al.*, 2001). Portanto, embora o fechamento estomático evite a perda excessiva de água através da transpiração ele causa uma diminuição na fotossíntese líquida (GREENWAY & MUNNS, 1980). Em algumas espécies de *Phaseolus*, por exemplo, aproximadamente dois terços da redução da taxa de assimilação de CO₂ em condições de salinidade foi atribuída à redução da condutância estomática (BAYUELO-JIMÉNEZ *et al.*, 2003).

Por outro lado, o acúmulo excessivo de íons tóxicos no mesofilo inibe a fotossíntese por meio de mecanismos não-estomáticos, reduzindo o conteúdo total de clorofila, o transporte de elétrons nos cloroplastos e, conseqüentemente, causando um decréscimo na eficiência do fotossistema II (TAIZ & ZEIGER, 2004; PARIDA *et al.*, 2003). Por exemplo, Bañuls & Primo-Millo (1992) consideram que a inibição na taxa de assimilação de CO₂, em plantas do gênero *Citrus* submetidas à salinidade, é conseqüência do acúmulo de cloreto nas folhas. Em adição, a baixa disponibilidade de água no solo pode afetar a atividade de algumas enzimas fotossintéticas como a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), a qual catalisa o primeiro passo da assimilação de CO₂ em plantas C₃ (SUDHIR & MURTHY, 2004). Garg & Singla (2004) observaram reduções no conteúdo de clorofila e na atividade da Rubisco em cultivares de grão-de-bico submetidos à salinidade. Ao contrário, na cianobactéria halotolerante *Aphanothece halophytica*, o conteúdo de Rubisco foi aumentado com o estresse salino (TAKABE *et al.*, 1988).

Além dos efeitos osmóticos e iônicos, mudanças na anatomia foliar induzidas pelo sal podem aumentar a resistência à difusão do CO₂ através do mesofilo até o sítio de redução nos cloroplastos, afetando desfavoravelmente os processos bioquímicos envolvidos na fotossíntese (LONGSTRETH & NOBEL, 1979; PARIDA *et al.*, 2004). Em cultivares de oliveira (*Olea europea* L.), a baixa concentração de CO₂ nos cloroplastos resultante da baixa condutância estomática e da elevada resistência difusiva do mesofilo foi a principal limitação para a fotossíntese em condições de estresse salino (LORETO *et al.*, 2003). Em outros casos, por exemplo, em girassol, o controle da taxa de assimilação de CO₂ em condições de salinidade ocorre principalmente pela redução da área foliar, ao invés do fechamento dos estômatos ou de modificações no aparato fotossintético (STEDUTO *et al.*, 2000).

2.4- Salinidade e o ajustamento osmótico

O ajustamento osmótico ou osmorregulação é um processo pelo qual o potencial osmótico celular é reduzido, devido ao acúmulo líquido de solutos inorgânicos e orgânicos, acarretando diminuição do potencial hídrico, sem que ocorra diminuição na turgescência celular (TAIZ & ZEIGER, 2004). É, portanto, uma resposta das plantas ao abaixamento do potencial hídrico do meio de cultivo, cuja principal finalidade é a manutenção da absorção de água. Este fenômeno ocorre tanto em halófitas quanto em glicófitas (HASEGAWA *et al.*, 2000) e tem sido considerado um importante mecanismo de aclimação das plantas às condições de seca ou de salinidade. O ajustamento osmótico pode contribuir para a manutenção de processos fisiológicos, tais como a abertura estomática, a fotossíntese e a expansão celular (SERRAJ & SINCLAIR, 2002). Em geral, os solutos inorgânicos, principalmente os íons Na^+ e Cl^- , são compartimentalizados no vacúolo, enquanto os orgânicos (carboidratos solúveis, N-aminossolúveis, prolina, betaínas, etc.) acumulam-se no citoplasma, equilibrando desta forma o potencial hídrico entre os diversos compartimentos celulares (ASHRAF & HARRIS, 2004).

A contribuição relativa desses solutos para o abaixamento do potencial osmótico varia com a espécie, entre cultivares de uma mesma espécie, entre órgãos e tecidos de uma mesma planta e até entre diversos compartimentos intracelulares (ASHRAF & HARRIS, 2004). Nas espécies *Suaeda physophora* (euhalófito) e *Haloxylon ammodendron* (xero-halófito) os solutos inorgânicos foram os mais importantes para a osmorregulação em ambientes salinos e áridos. No entanto, na xerófito *Haloxylon persicum* os solutos orgânicos desempenharam o papel principal no ajustamento osmótico em condições de seca (SONG *et al.*, 2006). Já em plantas de videira sob estresse hídrico, os íons inorgânicos forneceram a maior contribuição para a redução do potencial osmótico (PATAKAS *et al.*, 2002).

Do ponto de vista energético, o ajustamento osmótico utilizando íons inorgânicos é menos dispendioso do que através da síntese de solutos orgânicos (YEO, 1983; CHINNUSAMY *et al.*, 2005), a qual pode limitar o crescimento por desviar substratos de vias metabólicas essenciais para o crescimento, tais como a síntese de proteínas e de parede celular (MUNNS, 2005).

Há algum tempo, a hipótese de que o ajuste osmótico é uma característica importante de aclimação e que confere vantagens às plantas tolerantes, tanto ao estresse hídrico quanto ao salino, é aceita como sendo um modo de manter o conteúdo de água da célula em níveis adequados à atividade fisiológica. Essa visão do ajuste osmótico, como sendo um mecanismo de manutenção da turgescência e do crescimento do tecido sob deficiência hídrica ou de estresse salino é contestada por Munns (1993) que, com base em evidências experimentais, põe dúvidas sobre o papel da pressão de turgescência no controle do crescimento. Para este autor, o ajustamento osmótico seria mais uma aclimação para sobreviver ao estresse do que propriamente para manter o crescimento durante a ocorrência da deficiência. Além disso, se houvesse relação entre ajustamento osmótico e crescimento por aumento da matéria seca, isso representaria um paradoxo, pois um processo como o ajuste osmótico, que desvia solutos, em princípio destinados à expansão celular, acabaria prejudicando o próprio crescimento.

Corroborando com a idéia de Munns, Romero-Aranda *et al.* (2001) verificaram que devido ao ajustamento osmótico, houve um aumento da pressão de turgescência das folhas de dois cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) sob condições de salinidade. Apesar disso, observou-se uma redução da área foliar nos dois cultivares, sugerindo que embora a pressão de turgescência seja importante para a expansão celular, ela não é o único parâmetro que controla o processo de crescimento.

2.5- Salinidade e solutos inorgânicos

A sobrevivência das plantas em ambientes salinos depende da manutenção da concentração iônica intracelular, a qual é importante para a manutenção dos processos metabólicos que controlam o crescimento e o desenvolvimento da planta (NIU *et al.*, 1995). Contudo, a absorção elevada de íons Na^+ em condições de salinidade pode gerar toxicidade e impedir a aquisição de alguns nutrientes essenciais, gerando desbalanço iônico (ZHU, 2003). Com relação a este último fator, uma atenção maior tem sido dada ao estudo dos efeitos do estresse salino sobre a nutrição potássica das plantas. Isto se deve, principalmente, às similaridades físico-químicas entre os íons Na^+ e K^+ (MAATHUIS & AMTMANN, 1999; MÄSER *et al.*, 2002).

Para a maioria das plantas, o potássio é o principal nutriente inorgânico catiônico e desempenha várias funções na planta, tais como: 1- manutenção do potencial de membrana; 2- balanceamento de cargas no citoplasma, estabilizando o excesso de cargas negativas das proteínas e dos ácidos nucleicos; 3- serve como cofator para a ativação de reações enzimáticas e 4- contribui para a pressão osmótica do vacúolo e, assim, para a manutenção da turgescência celular (MAATHUIS & AMTMANN, 1999). Em condições fisiológicas normais, as células vegetais mantêm uma alta relação K^+/Na^+ no citosol (BINZEL *et al.*, 1988). Entretanto, quando as plantas são submetidas a estresse salino, ocorre uma alteração nessa relação a favor do íon Na^+ que, em altas concentrações, inibe as enzimas citosólicas tanto de glicófitas quanto de halófitas (FLOWERS *et al.*, 1977). A alteração dessa relação resulta do influxo passivo do sódio para dentro da célula através das vias de aquisição de potássio, favorecido pelo gradiente de potencial eletroquímico (BLUMWALD, 2000; APSE & BLUMWALD, 2002). Dessa forma, a capacidade das plantas de manterem altas relações K^+/Na^+ no citosol tem sido sugerida como um dos elementos-chave para tolerar o estresse salino e é muitas vezes utilizada como critério para selecionar materiais sensíveis e tolerantes à salinidade (ZHU,

2003; ASHRAF & HARRIS, 2004; AKTAS *et al.*, 2006; EKER *et al.*, 2006). A manutenção da relação K^+/Na^+ no citosol depende dos processos que controlam a absorção, o efluxo, a translocação e a compartimentalização de Na^+ nos vacúolos (MAATHUIS & AMTMANN, 1999).

O influxo de sódio segue o gradiente de concentração e é favorecido pelo potencial de membrana negativo da célula, em torno de -180 mV (MUNNS, 2005). O Na^+ pode entrar na célula através dos transportadores de K^+ devido à similaridade dos seus raios iônicos hidratados, que dificulta a discriminação desses dois íons pela proteína transportadora (BLUMWALD *et al.*, 2000). Nesse caso, transportadores de alta e de baixa afinidade por K^+ podem atuar no transporte de Na^+ quando este se encontra em altas concentrações no solo (MAATHUIS & AMTMANN, 1999). Além dos transportadores de K^+ , outra via de absorção do sódio parece acontecer através de canais iônicos não-seletivos (canais do tipo VICs - do Inglês, *voltage independent channels*), os quais têm recebido bastante atenção porque parecem ser inibidos por Ca^{2+} e, portanto, devem ser cruciais para a tolerância aos sais (AMTMANN & SANDERS, 1999). Adicionalmente, em algumas espécies vegetais como o arroz, o transporte de Na^+ através da via apoplástica é responsável pela presença de altas concentrações desse íon no fluxo transpiratório (YEO *et al.*, 1999).

Nas plantas, o principal mecanismo para o efluxo de Na^+ é mediado pelas H^+ -ATPases de membrana plasmática (BLUMWALD, 2000; MANSOUR *et al.*, 2003). As H^+ -ATPases são bombas eletrogênicas que realizam o transporte ativo primário de H^+ para fora da célula utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP (MICHELET & BOUTRY, 1995; NIU *et al.*, 1995). Como consequência, é gerado um gradiente de potencial eletroquímico que é utilizado na extrusão de Na^+ mediada por transportadores Na^+/H^+ do tipo antiporte presentes na membrana plasmática, os quais acoplam o movimento passivo de H^+ para dentro da célula ao movimento ativo de Na^+ para fora da célula, contra um gradiente de potencial

eletroquímico (BLUMWALD *et al.*, 2000; APSE & BLUMWALD, 2002). A comparação dos níveis de expressão da H⁺-ATPase de uma glicófito (*Nicotiana tabacum*) e de uma halófito (*Atriplex nummularia*), mostraram que a tolerância ao sal estava positivamente correlacionada com os níveis de transcritos (NIU *et al.*, 1993).

Além do efluxo de Na⁺ através da membrana plasmática, outro mecanismo importante para a manutenção da homeostase iônica é a compartimentalização dos íons no vacúolo. Esta é mediada por um transportador vacuolar Na⁺/H⁺ do tipo antiporte que utiliza o gradiente de potencial eletroquímico gerado pelas H⁺-ATPases e pirofosfatases localizadas na membrana do vacúolo (APSE & BLUMWALD, 2002). O funcionamento desses transportadores Na⁺/H⁺ do tipo antiporte é, provavelmente, de grande importância em plantas halotolerantes, enquanto que nas glicófitas com baixa tolerância aos sais, esse mecanismo não parece ser tão eficiente (GREENWAY & MUNNS, 1980). O acúmulo de grandes quantidades de Na⁺ (e Cl⁻) no vacúolo, evita seus efeitos deletérios em outras partes do citoplasma e favorece a entrada de água para dentro da célula mesmo em um ambiente de baixo potencial osmótico e hídrico (BLUMWALD, 2000; ZHU, 2003).

A superexpressão do gene *AtNHX1*, que codifica um transportador vacuolar Na⁺/H⁺ do tipo antiporte, conferiu maior tolerância às condições de estresse salino em plantas de *Arabidopsis thaliana* (APSE *et al.*, 1999), tomate (ZHANG & BLUMWALD, 2001) e trigo (XUE *et al.*, 2004). Em adição, Gaxiola *et al.* (2001) demonstraram, em experimentos realizados com *A. thaliana*, que a superexpressão do gene *AVP1*, o qual codifica para uma pirofosfatase vacuolar, também aumentou a tolerância das plantas à salinidade.

Embora não se saiba exatamente como as plantas percebem as elevadas concentrações externas de Na⁺, recentemente, a via SOS (*Salt Overly Sensitive*) foi caracterizada como de grande importância para a homeostase iônica das plantas e, conseqüentemente, para a tolerância ao estresse salino. Esta via de sinalização regula a expressão e a atividade de vários

transportadores para manter a homeostase do Na^+ , em condições de estresse salino (XIONG & ZHU, 2002; ZHU, 2003). Acredita-se que as altas concentrações externas de Na^+ induzam a liberação e a acumulação de Ca^{2+} no citosol que, por sua vez, funciona como um mensageiro secundário num sistema de transdução de sinal Ca^{2+} -dependente (BRESSAN *et al.*, 1998). A elevação da concentração de Ca^{2+} citosólica é percebida pela SOS3, uma proteína ligante de Ca^{2+} , a qual interage e ativa uma proteína quinase do tipo serina/treonina, a SOS2. Por fim, o complexo SOS3-SOS2 fosforila e ativa a proteína SOS1, que é um transportador Na^+/H^+ do tipo antiporte (SHI *et al.*, 2000; ZHU, 2001).

Diferentemente das gramíneas, onde o Na^+ é a causa primária dos danos, para as plantas lenhosas, tais como o *Citrus*, a influência negativa dos sais deve-se, particularmente, ao acúmulo de Cl^- nas folhas (TESTER & DAVENPORT, 2003). Portanto, o entendimento dos mecanismos de absorção e acumulação do Cl^- também são de grande relevância para o desenvolvimento de materiais tolerantes à salinidade. Entretanto, as informações sobre tais mecanismos são ainda muito escassas (TYERMAN & SKERRETT, 1999; WHITE & BROADLEY, 2001). Felle (1994), mostrou que o aumento da concentração de Cl^- no meio externo levou a uma diminuição transiente do pH citosólico das células radiculares de *Sinapis alba*, sugerindo que a sua absorção se dá por um processo ativo controlado por um simporte Cl^-/nH^+ , onde $n > 1$. Contudo, não existem evidências de que isto também constitua uma rota para o influxo de Cl^- em condições de estresse salino. Alternativamente, em altas concentrações de sais, esse transporte ocorreria passivamente através de canais permeáveis ao nitrato (SKERRETT & TYERMANN, 1994).

Lorenzen *et al.* (2004), trabalhando com *A. thaliana* em condições salinas (100 mM de NaCl), demonstraram que o influxo passivo de Cl^- se dava através de canais. Estes mesmos autores também verificaram que a diminuição do gradiente de pH transmembranar (aumento do pH externo) não era acompanhada por uma redução significativa na concentração de Cl^-

citossólico. Em adição, eles observaram uma inibição do influxo de Cl^- mediada por Ca^{2+} , o qual pode agir sobre os canais de cátions prevenindo, dessa forma, a despolarização da membrana necessária para a absorção passiva do Cl^- nas raízes. Como já é bem conhecido que o Ca^{2+} reduz o influxo de Na^+ em condições de estresse salino (TESTER & DAVENPORT, 2003), tais resultados sugerem que os mecanismos de transporte de Na^+ e Cl^- podem ser termodinamicamente acoplados.

A compartimentalização vacuolar do cloreto é uma adaptação essencial para a tolerância ao estresse salino (NIU *et al.*, 1995). Alguns autores sugerem que a compartimentalização do Cl^- no vacúolo pode ser alcançada através de canais, sendo o gradiente de pH gerado pelo bombeamento de prótons através do tonoplasto a principal força termodinâmica para o transporte. Alternativamente, a compartimentalização do Cl^- no vacúolo poderia ocorrer ativamente por um transportador H^+ /ânion do tipo antiporte (REA & SANDERS, 1987; NIU *et al.*, 1995).

2.6- Salinidade e solutos orgânicos

Sob condições de estresse osmótico, uma das principais alterações metabólicas que ocorre, na maioria das plantas, envolve a síntese e o acúmulo de solutos orgânicos de baixa massa molecular (SERRAJ & SINCLAIR, 2002; ASHRAF & HARRIS, 2004; CHINNUSAMY *et al.*, 2005). Os solutos que se acumulam em diferentes espécies incluem: ácidos orgânicos (malato, oxaloacetato, etc.), carboidratos solúveis (glicose, frutose, sacarose e trealose), poliálcoois de cadeia linear (glicerol, manitol e sorbitol), poliálcoois cíclicos (ononitol e pinitol), aminoácidos livres, iminoácidos (prolina e hidroxiprolina), betaínas (glicinabetaina e prolinabetaina) e poliaminas (putrescina, espermidina e espermina). Embora não sejam muito carregadas, as moléculas desses compostos são polares e altamente solúveis (BOHNERT *et al.*, 1995; SAIRAM & TYAGI, 2004).

Ao contrário dos solutos inorgânicos, que inibem as atividades de muitas enzimas citosólicas, os solutos orgânicos são compatíveis com as atividades metabólicas celulares, podendo se acumular em altas concentrações no citoplasma (BOHNERT & SHEN, 1999). Em condições de estresse salino, os solutos compatíveis são acumulados principalmente no citosol, promovendo o balanço hídrico entre o apoplasto, o citosol e o vacúolo (GREENWAY & MUNNS, 1980; PRISCO, 1980). Embora os mecanismos bioquímicos não sejam ainda conhecidos, acredita-se que além das propriedades estritamente osmóticas, tais solutos orgânicos possuem propriedades protetoras que ajudam a estabilizar a conformação de macromoléculas, complexos protéicos e membranas, além de protegerem as plantas removendo as ROS geradas secundariamente pelo estresse salino (SMIRNOFF, 1998; BOHNERT & SHEN, 1999). Além disso, podem também contribuir para o controle do pH citosólico e para o processo de desintoxicação do excesso de NH_4^+ em períodos de estresse (GILBERT *et al.*, 1998).

O papel dos solutos compatíveis na tolerância ao estresse salino tem sido demonstrado através do desenvolvimento de plantas transgênicas que superexpressam genes relacionados à síntese desses osmólitos (KAVI KISHOR *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1999; SAKAMOTO & MURATA, 2000; CHEN & MURATA, 2002). Plantas transformadas que sintetizam e acumulam uma variedade de osmólitos mostraram um aumento na capacidade de tolerar o estresse. Por exemplo, Abebe *et al.* (2003) demonstraram que plantas transgênicas de trigo, com capacidade de sintetizar e acumular manitol, foram mais tolerantes aos estresses hídrico e salino do que as não transformadas. Em adição, a transformação de plantas de arroz com um gene envolvido na biossíntese da trealose conferiu uma maior tolerância às condições de salinidade (GARG *et al.*, 2002).

Dentre os solutos orgânicos que podem ser acumulados em plantas cultivadas sob estresse, a prolina é a que tem recebido maior atenção. O acúmulo de prolina é induzido por

uma variedade de estresses bióticos e abióticos, podendo ocorrer devido ao aumento na síntese e/ou diminuição na oxidação deste iminoácido (HARE & CRESS, 1997; HARE *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2003). Por exemplo, em plântulas de trigo (*Triticum durum*), o aumento de atividade da redutase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) e a inibição da desidrogenase da prolina, enzimas que estão envolvidas com a síntese e com o catabolismo da prolina, respectivamente, foram responsáveis por seu acúmulo em condição de estresse salino (MATTIONI *et al.* 1997). Em adição, Verbruggen *et al.* (1996) mostraram que, em plantas de *A. thaliana*, os níveis de mRNA que codificam para a oxidase da prolina, a enzima que catalisa o primeiro passo da oxidação da prolina a glutamato, foram rapidamente reduzidos durante o estresse osmótico e que este declínio precedeu o acúmulo de prolina.

Várias funções são propostas para o acúmulo de prolina em tecidos vegetais submetidos ao estresse salino. Acredita-se que ela participe nos processos de: ajustamento osmótico, desintoxicação do excesso de NH_4^+ , estabilização de proteínas e/ou membranas, remoção de radicais livres, bem como possa servir como reserva de carbono e nitrogênio (ASHRAF & FOOLAD, 2007). Adicionalmente, alguns autores têm sugerido que ao invés do acúmulo de prolina *per si*, a via metabólica que leva a sua produção é que é importante para a aclimação das plantas à salinidade. Em condições de estresse, o desequilíbrio entre a captura da luz e a utilização do NADPH na fixação do carbono pode diminuir a disponibilidade de NADP^+ nos cloroplastos e causar fotoinibição. Dessa forma, a síntese de prolina, que é dependente de NADPH, poderia atuar como uma válvula protetora por meio da qual a regeneração do NADP^+ proporcionaria o efeito protetor observado (HARE & CRESS, 1997). Contudo, o papel benéfico do acúmulo de prolina para a tolerância das plantas ao estresse salino é ainda bastante controverso. Enquanto alguns trabalhos mostram uma correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a aclimação aos estresses hídrico e salino (CARCELLER *et al.*, 1999; SAWAHEL & HASSAN, 2002), o mesmo não é corroborado por

outros estudos (MOFTAH & MICHEL, 1987; LIU & ZHU, 1997; GILBERT *et al.*, 1998; VIÉGAS, 1999; COSTA *et al.*, 2003). De acordo com Delauney & Verma (1993), a ausência de uma correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a osmorregulação em algumas espécies não nega um papel adaptativo para a prolina. Nessas espécies, este fato pode refletir a predominância de outros mecanismos adaptativos, tais como alterações morfológicas (p.ex. desenvolvimento de sistema radicular mais profundo), desenvolvimentais (p.ex. redução do tempo de floração), fisiológicas (p.ex. seqüestro de íons no vacúolo) ou bioquímicas (p.ex. síntese e acúmulo preferencial de outros solutos orgânicos).

2.7- Salinidade e estresse oxidativo

Como consequência do metabolismo aeróbico normal, um dos eventos comuns que ocorre nas plantas é a formação de ROS (APEL & HIRT, 2004). Em plantas sob condições normais, os sistemas antioxidativos de defesa (não enzimáticos e enzimáticos) que estão presentes em diversos compartimentos subcelulares são, em geral, suficientes para evitar a acumulação de ROS. Entretanto, em condições de estresse, a produção de ROS pode não ser adequadamente regulada e, dessa forma, pode exceder a capacidade de neutralização desses sistemas antioxidativos (KANG & SALTVEIT, 2001; FOYER & NOCTOR, 2003). As ROS produzidas durante o metabolismo normal ou sob condições de estresse incluem: o oxigênio *singlete* ($\uparrow\text{O}_2$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais livres superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroxila (HO^{\bullet}) (MITTLER, 2002). As ROS são altamente reativas e tóxicas, sendo capazes de alterar o metabolismo celular normal através da oxidação de vários componentes celulares, tais como os lipídios de membrana, ácidos nucleicos e proteínas (ALSCHER *et al.*, 1997; SMIRNORFF, 1998). Portanto, o acúmulo excessivo dessas espécies químicas acarreta sérios prejuízos para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Em situações de estresse salino, as alterações fisiológicas e bioquímicas induzidas pelos efeitos osmóticos e iônicos dos sais podem ser acompanhadas por um aumento na produção de ROS nas células vegetais (MITTLER *et al.*, 2004). Uma das principais razões para isto é que o estresse salino limita as trocas gasosas e, desta forma, o suprimento de CO₂ para as folhas. A limitada fixação do CO₂ causa, então, um decréscimo na velocidade do ciclo de Calvin e, conseqüentemente, na disponibilidade de NADP⁺ para captar os elétrons provenientes do fotossistema I. Tal situação favorece a redução monovalente do oxigênio molecular nesse fotossistema, gerando o radical superóxido (reação de Mehler) a partir do qual são originadas as outras ROS nas células (DEMIRAL & TÜRKAN, 2005; EDREVA, 2005).

O radical superóxido pode ser produzido em vários compartimentos celulares, incluindo mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos ou ainda ser produzido enzimaticamente na membrana plasmática pela oxidase do NADPH, a qual transfere elétrons do NADPH citosólico para o O₂ (BÉRCZI & MØLLER, 2000). Uma vez produzido, o O₂^{•-} é rapidamente dismutado em H₂O₂ e O₂ (VAN BREUSEGEM *et al.*, 2001). Embora o cloroplasto seja a fonte primária de H₂O₂ nas plantas, durante o processo de fotorrespiração nos peroxissomos a ação da enzima oxidase do glicolato representa uma outra fonte de produção de H₂O₂ (SIEDOW & DAY, 2000). O H₂O₂ produzido na célula pode ser convertido, na presença de íons Fe²⁺, em radicais HO[•] através da reação de Fenton, um componente do ciclo de Haber-Weiss (McKERSIE & LESHEM, 1994). O oxigênio *singleto*, por sua vez, é formado principalmente nos processos fotoquímicos no cloroplasto (EDREVA, 2005).

Para minimizar os danos oxidativos causados pelas ROS, as plantas dispõem de um complexo sistema antioxidativo que inclui tanto antioxidantes não-enzimáticos de baixa massa molecular (principalmente o ascorbato e a glutatona) quanto enzimas eliminadoras de ROS, tais como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases do

ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX) (McKERSIE & LESHEM, 1994; NOCTOR & FOYER, 1998). A SOD representa a primeira linha de defesa contra as ROS, catalisando a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , o qual é metabolizado a H_2O pela CAT e diferentes classes de peroxidases (McKERSIE & LESHEM, 1994; ALSCHER *et al.*, 2002). Portanto, os sistemas enzimáticos são destinados a minimizar as concentrações de superóxido e peróxido de hidrogênio, formas químicas menos reativas e precursoras do radical hidroxila.

Nos últimos anos, diversos estudos têm fornecido evidências de que a tolerância à salinidade em algumas espécies ou cultivares deve-se, pelo menos em parte, à presença de sistemas antioxidativos mais eficientes na eliminação das ROS (MITTOVA *et al.*, 2002; VAIDYANATHAN *et al.*, 2003; DEMIRAL & TÜRKAN, 2005; AMOR *et al.*, 2005; AZEVEDO NETO *et al.*, 2006).

2.8- Aclimação e adaptação das plantas ao estresse salino

No estudo das respostas das plantas a condições de estresse salino, é importante diferenciar as mudanças que ocorrem durante a vida do indivíduo e aquelas que são resultado de vários ciclos de seleção natural ou artificial de genes e que, portanto, fazem parte da estrutura genética da espécie. No primeiro caso, as mudanças ocorrem em decorrência de modificações fisiológicas temporárias, envolvendo uma série de processos metabólicos em resposta à presença do estresse, dando origem a um processo conhecido como aclimação. No segundo, há uma série de alterações morfo-fisiológicas definitivas que conduzem à evolução da espécie num processo denominado de adaptação. Embora os processos de aclimação e de adaptação envolvam alterações na expressão gênica, somente os mecanismos de adaptação são transmitidos de uma geração para outra.

As respostas das plantas à salinidade ocorrem tanto a nível celular quanto da planta como um todo (YEO, 1998; MANSOUR & SALAMA, 2004). Tais respostas incluem o

acúmulo seletivo ou a exclusão de íons, o controle na absorção dos íons pelas raízes, a síntese de solutos compatíveis, mudanças na rota fotossintética, alteração na estrutura das membranas, indução de enzimas antioxidantes e de hormônios vegetais (PARIDA & DAS, 2005).

Um dos mecanismos de tolerância à salinidade que tem recebido bastante atenção é a compartimentalização intracelular dos sais. Como sugerido por [Cheeseman \(1988\)](#), a quantidade de íons que atinge as folhas deve ser limitada para não ultrapassar a capacidade de compartimentalização dos mesmos no vacúolo. As halófitas e glicófitas diferem com relação à eficiência desse controle. Enquanto que nas glicófitas esse controle não é tão eficiente, nas halófitas a compartimentalização dos sais que alcançam as folhas via xilema permite que eles sejam utilizados no ajustamento osmótico sem causar efeitos tóxicos no citosol ([GREENWAY & MUNNS, 1980](#)). De acordo com [Munns \(2002\)](#), um modo de aumentar a tolerância das plantas à salinidade seria através de um controle mais eficiente no transporte de íons tóxicos para os órgãos aéreos transpirantes, acumulando-os nas raízes. Por sua vez, o grau de acúmulo de sais nas raízes é função dos processos de exclusão, compartimentalização, velocidade de carregamento e reabsorção de sais no xilema, e depende da seletividade na absorção de íons nas células das raízes ([TESTER & DAVENPORT, 2003](#)). Em adição, o fechamento dos estômatos reduz o fluxo transpiratório no xilema e, conseqüentemente, o transporte de íons para a parte aérea ([ROBINSON et al., 1997](#)). A retranslocação dos sais a partir das folhas para outros órgãos também pode contribuir para a manutenção do conteúdo de sais nas folhas, embora ela seja menor do que a quantidade de sais que chega pelo fluxo transpiratório ([MUNNS, 2002](#)). Muitas halófitas possuem glândulas especializadas que removem os sais que alcançam as folhas e os lançam para o meio externo, mantendo a concentração iônica em níveis baixos ([FLOWERS et al., 1977](#)).

As respostas das plantas à salinidade são muitas vezes acompanhadas por alterações morfológicas e anatômicas (KOZLOWSKI, 1997). Por exemplo, em algumas plantas sob condições de estresse salino, a espessura do mesofilo foliar aumenta devido ao aumento no número e comprimento das células paliçádicas e no número de camadas de células paliçádicas e esponjosas (LONGSTRETH & NOBEL, 1979; PARIDA *et al.*, 2004). É observado, também, aumentos na quantidade de água por área foliar, ou suculência foliar, à medida que as plantas são expostas a doses crescentes de sais no meio de cultivo (JENNINGS, 1968; PARIDA *et al.*, 2004). Adicionalmente, ocorre um aumento da suberização das células endodérmicas radiculares e da formação das estrias de Caspary em plantas salinizadas, reduzindo o transporte de Na⁺ pela via apoplástica (REINHARDT & ROST, 1995).

2.9- Salinidade e o estudo da expressão gênica de plantas

A tolerância ao estresse salino em plantas tem sido considerada uma característica complexa (FLOWERS, 2004), envolvendo alterações na maquinaria celular que resultam diretamente de modificações na expressão de vários genes (HURKMAN, 1992). De fato, o estresse salino, assim como outros estresses abióticos, exerce um forte efeito na expressão gênica das plantas (HASEGAWA *et al.*, 2000; RAMANJULU & BARTELS, 2002; RENSINK *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2006). Desse modo, a análise do padrão de expressão gênica é de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos de aclimação e adaptação das plantas submetidas ao estresse salino.

Em condições de salinidade, a expressão de muitos genes pode ser aumentada ou diminuída (SINGH *et al.*, 1985; ALI *et al.*, 1999), enquanto que a de outros pode ser totalmente reprimida ou induzida (SEKI *et al.*, 2002). Vários genes cuja expressão é ativada em resposta ao estresse salino têm sido identificados (KAWASAKI *et al.*, 2001). Os produtos desses genes podem atuar na osmorregulação, como transportadores de membrana,

controlando o fluxo de água e de íons, ou como enzimas envolvidas na síntese de solutos compatíveis. Adicionalmente, outras proteínas podem ser induzidas com o objetivo de minimizar os danos celulares causados por substâncias tóxicas geradas pelo estresse salino, tais como as ROS (SAIRAM & TYAGI, 2004). De acordo com Munns (2005), os genes candidatos para conferir tolerância à salinidade caem em três principais categorias funcionais: 1- genes que controlam a absorção e o transporte de sais; 2- genes com funções osmóticas e protetoras; e 3- genes que regulam o crescimento das plantas em ambientes salinos.

Os estudos da expressão gênica em plantas submetidas ao estresse salino têm-se beneficiados, nos últimos anos, com os avanços nas técnicas de biologia molecular e do número crescente de plantas com genomas seqüenciados (SAIRAM & TYAGI, 2004). Dessa forma, várias abordagens têm sido empregadas para o estudo de genes cuja expressão é influenciada pela salinidade. Dentre elas, a análise dos níveis de mRNA (transcriptoma) utilizando a técnica de microarranjos (do Inglês, *microarray*) de DNA, permite o estudo da expressão gênica através da análise diferencial dos níveis de transcritos (mRNA) expressos após a exposição ao sal (RENSINK & BUELL, 2005). Utilizando essa tecnologia, Kawasaki *et al.* (2001) e Seki *et al.* (2002) descreveram as modificações no perfil de expressão gênica em plantas de *Arabidopsis* e de arroz em condições de salinidade. No caso das plantas de arroz, mais de 400 genes foram induzidos dentro de 90 minutos de exposição do cultivar tolerante (Pokkali) a 150 mM de NaCl (KAWASAKI *et al.*, 2001). Em adição, as respostas de plantas de batata ao frio, calor e ao estresse salino foram monitoradas através de microarranjos (RENSINK *et al.*, 2005).

As informações sobre os níveis de mRNA não são suficientes para entender completamente os mecanismos pelos quais a expressão dos genes é regulada dentro da célula, pois o controle desse processo também ocorre através de modificações pós-traducionais na atividade da proteína, ou seja, nem sempre os níveis de transcritos mantêm relação direta com

os níveis de proteínas e, por conseguinte, de atividade biológica (GYGI *et al.*, 1999; MANN & JENSEN, 2003). Dessa forma, análises quantitativas da expressão gênica a nível de proteínas são essenciais e podem ser mais informativas do que a análise de transcriptomas para se compreender a função gênica (BOUCHEZ & HÖFTE, 1998).

Segundo Wilkins *et al.* (1996), o proteoma de um organismo refere-se ao conjunto total de proteínas codificadas por seu genoma. Portanto, o termo “proteômica” envolve o estudo global dessas proteínas, incluindo mudanças nas suas estruturas e na abundância em resposta a estímulos desenvolvimentais e ambientais (VAN WIJK, 2001). Atualmente, a abordagem proteômica tem recebido bastante atenção e promete ser muito promissora para se compreender a complexidade das respostas das plantas ao estresse salino ou osmótico (SALEKDEH *et al.*, 2002; ALI & KOMATSU, 2006; RAMPITSCH & SRINIVASAN, 2006; ZANG & KOMATSU, 2007).

A técnica mais comumente utilizada para a análise global das proteínas é a eletroforese bidimensional (2D), a qual fornece informações de mudanças na abundância e na mobilidade eletroforética das proteínas, sendo que esta última reflete modificações pós-traducionais, tais como fosforilação e glicosilação de alguns resíduos de aminoácidos (SALEKDEH *et al.*, 2002). Em uma análise proteômica, as proteínas separadas por eletroforese 2D podem ser extraídas do gel, seqüenciadas diretamente ou fragmentadas em peptídeos com uma enzima proteolítica (ex. tripsina) sendo, em seguida, as massas dos fragmentos resultantes determinadas por espectrometria de massa (GYGI *et al.*, 2000; MO & KARGER, 2002). Posteriormente, os dados das seqüências e do padrão de massa dos fragmentos peptídicos são comparados com as informações já existentes em bancos de dados a fim de identificar a proteína em questão (MANN & PANDEY, 2001; CULLIS, 2004). Portanto, a comparação dos padrões protéicos bidimensionais obtidos de plantas estressadas e não-estressadas constitui a primeira etapa na identificação dos produtos dos “genes do estresse”. Estes, por

sua vez, poderão ser utilizados futuramente para melhorar a tolerância das plantas por transferência de genes ([HOLMBERG & BÜLOW, 1998](#)).

3- MATERIAL E MÉTODOS

As respostas fisiológicas e bioquímicas ao estresse salino foram estudadas em plântulas de cajueiro anão-precoce cultivadas em duas condições ambientais. Para isso, experimentos foram conduzidos simultaneamente, em casa de vegetação e em sala de germinação pertencentes ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, durante os meses de agosto e setembro de 2006.

3.1- Semeadura e condições de cultivo

Nos experimentos, foram utilizadas castanhas de cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.), clone CCP 06, fornecidas pela Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará. Após seleção, as castanhas foram tratadas com o fungicida Metiltiofan (SIPCAM Agro S.A., São Paulo) a 0,1%, por 10 min e, em seguida, semeadas em bandejas de polietileno (25 cm x 25 cm x 11 cm) contendo vermiculita umedecida com água destilada na proporção de 2:1 (v/v). As castanhas, em número de vinte por bandeja, foram semeadas em covas de 2,0 cm de diâmetro por 4,5 cm de profundidade, em posição vertical e com o ponto de inserção do pedúnculo na castanha voltado para cima, conforme [Cavalcanti Junior \(1994\)](#). As bandejas, contendo as castanhas semeadas, foram mantidas em casa de vegetação ou em sala de germinação, sendo nesta última distribuídas em uma estante de metal, com prateleiras de madeira iluminadas com quatro lâmpadas fluorescentes (duas brancas e duas Grolux) de 40 W cada, sob um fotoperíodo de 12 h. Aos 20 dias após a semeadura (DAS), as plântulas da casa de vegetação apresentando seis folhas, sendo quatro folhas completamente expandidas e duas folhas imaturas na extremidade apical do caule ([Figura 1A](#)), foram transferidas para meios hidropônicos em bacias de polietileno contendo 10 L de solução nutritiva de Hoagland (10 plântulas por bacia). Já na sala de germinação, a transferência das plântulas para os meios



Figura 1. Plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas sob condições de casa de vegetação (A) e de sala de germinação (B) no dia da transferência para os meios hidropônicos. As plântulas apresentavam seis folhas, sendo quatro folhas completamente expandidas e duas folhas imaturas na extremidade apical do caule.

hidropônicos ocorreu aos 31 DAS, quando estas alcançaram o mesmo estágio de desenvolvimento das plântulas crescidas na casa de vegetação (quatro folhas completamente expandidas e duas folhas imaturas na extremidade apical do caule) (Figura 1B). Decorridos cinco dias de aclimação na solução nutritiva, foram selecionadas, quanto à uniformidade, 50 plântulas de cada condição ambiental de cultivo, as quais foram transferidas para vasos de polietileno (duas plântulas por vaso), contendo 6 L de solução nutritiva (tratamento controle) ou solução nutritiva com NaCl a 50, 100, 150 e 200 mM (tratamentos salinos). Para cada tratamento foram feitas cinco repetições, sendo cada repetição formada por duas plântulas num vaso. As adições de sal ocorreram em parcelas de 50 mM por dia e iniciaram-se no momento do transplante para os vasos. Os níveis das soluções nos vasos foram mantidos pela adição de água destilada e, após 10 dias, a solução nutritiva foi trocada por uma nova. Tanto na casa de vegetação quanto na sala de germinação, a coleta das plântulas realizou-se aos 18 dias após o início da primeira adição de NaCl.

Durante o período experimental, os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar, registrados com termohigrógrafos, foram de $28,7 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ e $64,3 \pm 3,5\%$ no interior da casa de vegetação, e de $24,1 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e $71,9 \pm 5,4\%$ na sala de germinação, respectivamente. As médias das temperaturas máximas e mínimas na casa de vegetação foram de $35,5 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ e $24,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, e de $24,7 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ e $23,7 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ na sala de germinação, respectivamente. A radiação fotossinteticamente ativa na sala de germinação e na casa de vegetação foram de 42,6 e $1560 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (medida às 11:00h), respectivamente.

3.2- Medidas de crescimento

Durante a coleta, as duas plântulas de cada vaso, foram divididas em folhas, caules + pecíolos e raízes e cada uma dessas partes foi reunida formando uma única amostra. Em seguida, esse material foi utilizado para as medidas de área foliar (AF), o que foi feita com o

medidor de área LI-3100 (Area Meter, Li-Cor., Inc, Lincoln, Nebraska, USA), e de matéria fresca (MF) das diferentes partes coletadas. As matérias secas (MS) das folhas e das raízes foram obtidas após a secagem em liofilizador, enquanto que a dos caules + pecíolos foi determinada após três dias de secagem em estufa a 60°C, quando atingiram peso constante. Com essas medidas, foi estimada a relação de matéria seca da parte aérea pela das raízes (MSPA/MSR).

3.3- Parâmetros fotossintéticos e eficiência no uso da água

No dia anterior à coleta, entre 8:00 e 12:00 h do dia, foram medidas a taxa de fotossíntese líquida, a taxa de transpiração, a relação entre a concentração de CO₂ interna e externa (C_i/C_e) e a condutância estomática. Para isso, utilizou-se um analisador portátil de gás no infravermelho (IRGA, mod. LCI, ADC, Hoddesdon, UK), portando uma fonte de luz com intensidade de 1500 μmol.m⁻².s⁻¹ (ADC, Hoddesdon, UK). As medições foram feitas em uma das quatro folhas mais velhas completamente expandidas de cada plântula e em condições de temperatura e umidade do ar ambientais.

A eficiência no uso da água (*EUA*) foi calculada dividindo-se a taxa de fotossíntese líquida pela taxa de transpiração, sendo expressa em μmol de CO₂ fixado por mmol de H₂O transpirada.

3.4- Determinação de clorofila

Para as determinações dos teores de clorofila, de uma das plântulas de cada vaso, utilizou-se uma das quatro folhas mais velhas (completamente expandidas). De cada uma dessas folhas, foram retirados cinco discos foliares de 1,0 cm de diâmetro, os quais foram macerados em almofariz com 10 mL de acetona a 80% (v/v). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3000 x g por 10 min e o sobrenadante submetido à leituras de absorvância em

663 (A_{663}) e 645 (A_{645}) nm. As concentrações de clorofilas (clf) a e b , em mg.L^{-1} , foram estimadas através das seguintes fórmulas, baseadas nos coeficientes de absorção específicos descritos por [Arnon \(1949\)](#):

$$\text{clf } a = 12,7A_{663} - 2,69A_{645}; \quad \text{clf } b = 22,9A_{645} - 4,68A_{663}; \quad \text{clf } (total) = 20,2A_{645} + 8,02A_{663}$$

Os teores das clorofilas foram expressos em $\mu\text{g.cm}^{-2}$.

Os teores relativos de clorofila total foram estimados com um medidor de clorofila portátil (Minolta SPAD-502, Osaka, Japão). As medidas foram feitas nas quatro folhas mais velhas e aos 15 dias após o início das adições de sal. Os resultados foram expressos em unidades de leituras dadas pelo aparelho, as quais foram comparadas por análise de regressão com os teores de clorofila determinados segundo o método de [Arnon \(1949\)](#).

3.5- Potencial osmótico foliar

Durante a coleta, de uma das plântulas de cada vaso, retirou-se uma das quatro folhas mais velhas (completamente expandidas), sendo este material congelado e armazenado a -25°C para posterior extração do suco e determinação do potencial osmótico (Ψ_s). Para obtenção dos sucos foliares, o material, após degelo, foi macerado em almofariz, à temperatura ambiente, seguido de prensagem do mesmo (envolto num tecido de náilon) com o êmbolo de uma seringa descartável de 10 mL. O líquido obtido após a prensagem foi centrifugado a $12000 \times g$ por 10 min e o sobrenadante utilizado para a determinação do Ψ_s em um microosmômetro (VAPRO 5520, Wescor, Logan, Utah, USA), tomando-se uma alíquota de 10 μL . Os valores de Ψ_s foram expressos em MPa.

3.6- Determinação dos teores de solutos inorgânicos

Os teores de sódio, potássio e cloreto foram determinados em tecidos de folhas e raízes. Os extratos foram preparados a partir da homogeneização de 100 mg do material

vegetal liofilizado, finamente triturado, com 10 mL de água desionizada, durante 30 min sob agitação constante. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3000 x g por 10 min, sendo o sobrenadante filtrado em papel de filtro e armazenado a -25°C. Os teores de sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama, segundo [Malavolta *et al.* \(1989\)](#). Para a determinação dos teores de cloreto, a 3,0 mL do extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL do reagente formado pela mistura de Hg(SCN)₂ a 13,2 mM, em metanol, e Fe(NO₃)₃.9H₂O a 20,2%, em água desionizada, na proporção de 4:1. Após agitação vigorosa, os tubos permaneceram em repouso por 15 min, sendo os teores de cloreto estimados através de leituras de absorbância em 460 nm, utilizando-se NaCl como padrão ([GAINES *et al.*, 1984](#)). Para a determinação dos íons sódio e potássio foi realizada uma única leitura do extrato (repetição), convenientemente diluído, no fotômetro de chama, enquanto que, para a determinação de cloreto, cada extrato (repetição) foi dosado em duplicata. Os teores de solutos inorgânicos foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

3.7- Determinação dos teores de solutos orgânicos

Os solutos orgânicos (prolina, carboidratos solúveis e N-aminossolúveis) foram determinados nos mesmos extratos utilizados nas determinações dos teores de íons inorgânicos.

3.7.1- Concentração de prolina livre

Os teores de prolina livre foram determinados de acordo com [Bates *et al.* \(1973\)](#). Em uma alíquota de 1,0 mL do extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 1,0 mL do reagente da ninidrina ácida e 1,0 mL de ácido acético glacial. Para um total de 50 amostras, o reagente da ninidrina ácida foi preparado dissolvendo-se 1,25 g de ninidrina em 30 mL de ácido acético e 20 mL de ácido fosfórico a 6 M. Os tubos de ensaio foram hermeticamente

fechados e, após a homogeneização da mistura de reação, colocados em banho-maria a 100°C por 1 h. A reação foi interrompida colocando-se os tubos de ensaio em banho de gelo. Após o resfriamento, foram adicionados 2,0 mL de tolueno ao meio de reação. Após agitação vigorosa da solução, a fase superior menos densa (cromóforo + tolueno) foi aspirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e submetida à leitura de absorvância em 520 nm, sendo o tolueno utilizado como branco. Os teores de prolina livre foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de prolina.

3.7.2- Concentração de carboidratos solúveis

Os carboidratos solúveis foram determinados de acordo com [Dubois *et al.* \(1956\)](#). A 0,5 mL dos extratos, convenientemente diluídos, foram adicionados 0,5 mL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 10 min para o seu resfriamento. Em seguida, as amostras foram submetidas à quantificação dos carboidratos solúveis por meio de leituras de absorvância em 490 nm. A curva padrão de carboidratos foi obtida utilizando-se a D(+) glicose anidra.

3.7.3- Concentração de N-aminossolúveis

Os N-aminossolúveis foram determinados de acordo com o método de [Yemm & Cocking \(1955\)](#). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL dos extratos, convenientemente diluídos, 0,25 mL de tampão citrato a 0,2 M (pH 5,0), 0,5 mL de KCN a 0,2 mM em metilcelosolve a 100% e 0,1 mL de ninidrina a 5% em metilcelosolve 100%. Em seguida, os tubos foram fechados, agitados vigorosamente e colocados em banho-maria a 100°C durante 20 min. A reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo e, após resfriamento, foram adicionados 0,65 mL de etanol a 60%. Os teores de

N-aminossolúveis foram estimados através de leituras de absorvância em 570 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de glicina.

Para determinação dos solutos orgânicos, cada extrato (repetição) foi dosado em duplica, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS.

3.8- Extração das proteínas e obtenção dos padrões eletroforéticos bidimensionais

Os padrões eletroforéticos de folhas e raízes foram obtidos de plântulas de cajueiro anão-precoce cultivadas em casa de vegetação e em sala de germinação, sob condições controle e de estresse salino (NaCl a 150mM). Exceto quando especificado, todas as operações para a extração das proteínas foram realizadas a 4°C. Cerca de 200 mg do tecido vegetal liofilizado foram misturadas, juntamente com 200 mg de PVPP, em 5,0 mL de tampão Tris-HCl a 40 mM, pH 7,5, contendo sacarose a 250 mM, EDTA a 10 mM, Triton X-100 a 1%, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) a 1,0 mM e ditioneitol (DTT) a 1,0 mM. A suspensão foi agitada por 60 min e, em seguida, centrifugada a 15000 x g por 15 min. Para precipitação das proteínas, ao sobrenadante foram adicionados 10 mL de TCA a 10%, em acetona gelada, sendo a mistura, após homogeneização, deixada em repouso por uma noite a -20°C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 15000 x g por 15 min, sendo o precipitado lavado por quatro vezes com acetona gelada. O esquema de obtenção das proteínas encontra-se representado na [Figura 2](#).

As proteínas precipitadas com acetona foram ressuspensas com 300 μL do tampão de lise, o qual continha uréia a 7 M, tiouréia a 2 M, CHAPS a 2%, IPG buffer a 2% (pH 3-10, Amersham Biosciences, Sweden) e DTT a 0,3%, como descrito previamente por [Rabilloud et al. \(1997\)](#). As proteínas foram solubilizadas por um período mínimo de 60 min, à temperatura ambiente, com agitações vigorosas ocasionais. Após centrifugação da suspensão por 10 min a 12000 x g, determinou-se a concentração de proteínas no sobrenadante, utilizando-se o

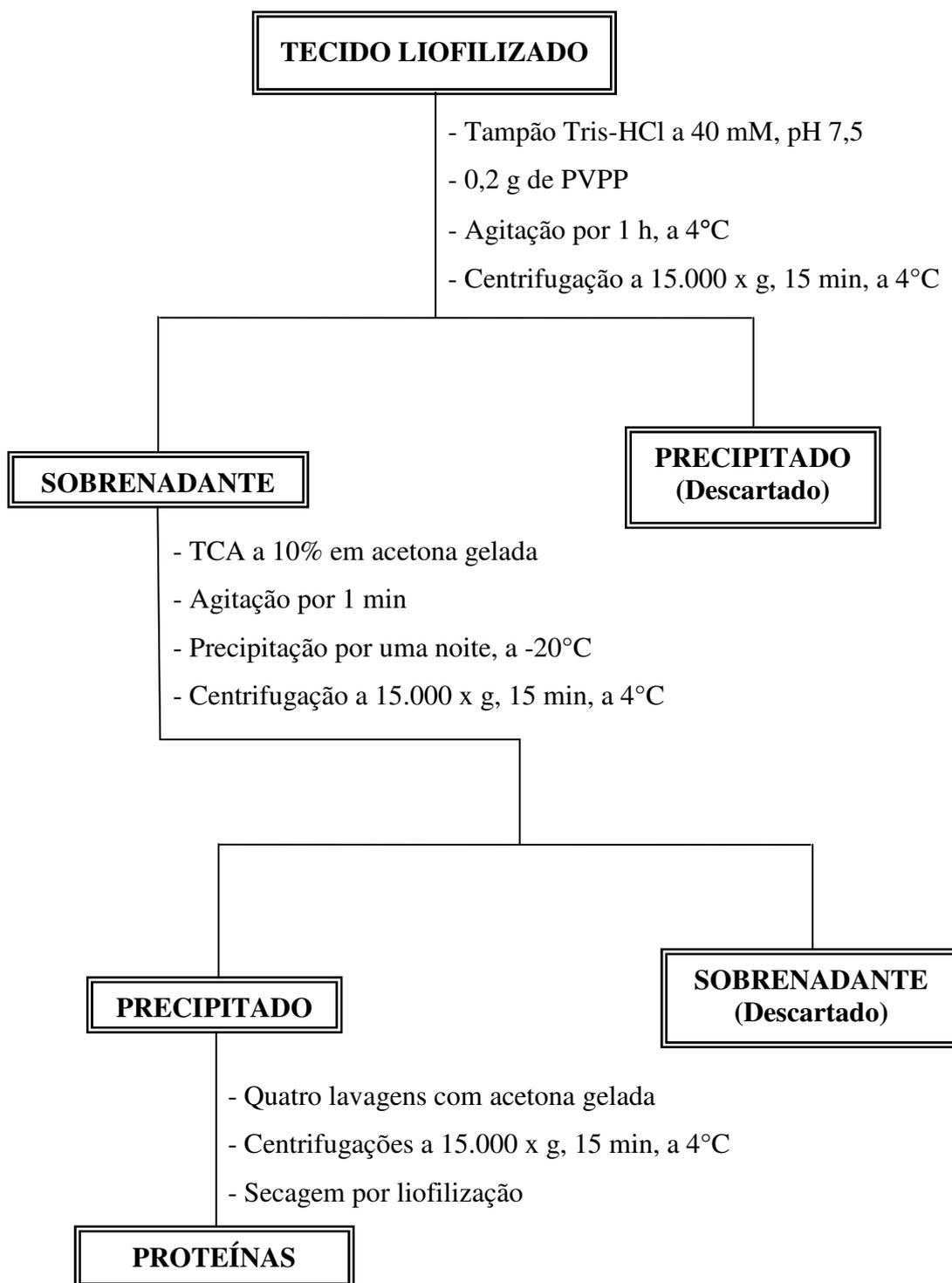


Figura 2. Fluxograma da extração e obtenção das proteínas de folhas e de raízes das plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06.

método de [Bradford \(1976\)](#) e utilizando a albumina sérica bovina como padrão. Alíquotas com volumes apropriados, contendo aproximadamente 50 µg de proteínas, foram diluídas para um volume final de 0,25 mL com o tampão de reidratação (uréia a 8 M, CHAPS a 2%, IPG buffer a 2% e pH 3-10, DTT a 0,3% e pequenas quantidades de azul de bromofenol) e aplicadas em tiras de gel com gradiente de pH de 4,0 a 7,0 (*DryStrip IPG* pH 4-7, Amersham Biosciences, Sweden). Essas tiras foram reidratadas por aproximadamente 13 h, numa bandeja de reidratação (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*), à temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram submetidas à focalização isoeétrica (primeira dimensão), à temperatura constante de 20°C, em um sistema Multiphor II (Pharmacia Biotech, France). A corrida foi realizada em três fases com uma fonte de eletroforese EPS 3501 XL (Amersham Biosciences, Sweden) no módulo gradiente. A voltagem foi inicialmente aumentada para 300 V durante 5 min, em seguida, aumentada lentamente para 3500 V por 1:30 h e finalmente mantida em 3500 V por 4:10 h.

Após a focalização isoeétrica, as tiras foram primeiro equilibradas por 15 min com DTT a 1%, em um meio contendo Tris-HCl a 50 mM, pH 8,8, uréia a 6 M, glicerol a 30%, SDS a 2% e pequenas quantidades de azul de bromofenol e, então, por 15 min, com iodoacetamida a 2,5% no mesmo meio. Após o equilíbrio, as tiras foram rapidamente lavadas com o tampão de corrida para remover o excesso de tampão de equilíbrio e seladas com agarose a 0,5% no topo do gel de poliacrilamida a 12,5%. A eletroforese, na segunda dimensão, foi realizada em um sistema convencional SDS-PAGE vertical ([LAEMMLI, 1970](#)), utilizando-se uma unidade de eletroforese vertical SE 600 Ruby (Amersham Biosciences, Sweden). A eletroforese 2D foi realizada em duas fases com a fonte de eletroforese EPS 3501 XL (Amersham Biosciences, Sweden). Para cada gel, foi aplicada uma corrente constante de 15 mA durante 30 min e, em seguida, uma corrente de 25 mA até o azul de bromofenol atingir o final do gel (aproximadamente 5 h). Foram utilizados géis com dimensões de 160 x 180 x

Tabela 1. Composição do gel utilizado na eletroforese (SDS-PAGE).

Soluções estoques	Volume	Concentração final
Acrilamida (30%, m/v)-bisacrilamida (0,8% m/v)	16,7 mL	12,5%
Tampão Tris-HCl a 1,5 M, pH 8,8	10 mL	0,375 M
Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%	0,4 mL	0,1%
Persulfato de amônio a 10%	200 µL	0,05%
N, N, N', N'-Tetrametilenodiamino (TEMED)	13,5 µL	0,03%
H ₂ O milli-Q	q.s.p. 40 mL	

1,5 mm, cuja composição encontra-se na **Tabela 1**. Juntamente com a amostra, foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas (Dalton Mark VII-L, Molecular Weight Range: 14.000-70.000, Sigma Chemical Company, USA).

Após a segunda dimensão, as proteínas no gel foram fixadas durante uma noite com uma solução aquosa de ácido acético a 10% e etanol a 40% e então coradas com prata como descrito por [Blum *et al.* \(1987\)](#), com pequenas modificações. Os padrões protéicos foram digitalizados usando o ImageScanner calibrado modelo UTA-1100 (Amersham Biosciences, Sweden).

3.8.1- Análises dos padrões protéicos

Para cada amostra, foram preparados dois géis, dos quais um foi selecionado como de referência. A intensidade dos *spots* protéicos nos géis foi determinada através do software Imagemaster 2D Platinum, versão 6.0 (Amersham Biosciences, Sweden). As variações na expressão de proteínas foram consideradas válidas somente quando as mudanças nos valores das intensidades dos *spots* eram maiores do que duas vezes.

3.9- Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado nos experimentos na casa de vegetação e na sala de germinação foi o inteiramente casualizado. Os experimentos foram conduzidos com cinco repetições e cada repetição constituiu-se de duas plântulas, perfazendo 25 vasos e 50 plântulas, em cada experimento. Os resultados foram analisados com base nas médias \pm o desvio padrão. A análise de regressão entre os teores de clorofila (estimados espectrofotometricamente) e as leituras do SPAD-502 foi feita utilizando-se o software SigmaPlot 9.0.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Crescimento vegetativo

Analisando-se os dois experimentos, observou-se que o crescimento e o desenvolvimento das plântulas de cajueiro anão-precoce foram influenciados tanto pelos tratamentos salinos quanto pelas condições ambientais em que elas foram cultivadas. As plântulas de cajueiro cultivadas em casa de vegetação se desenvolveram mais rápido do que aquelas da sala de germinação, já que estas últimas sofreram um retardo de 11 dias para atingir o mesmo estágio de desenvolvimento daquelas da casa de vegetação (quatro folhas completamente expandidas e duas imaturas na extremidade apical do caule). Essa diferença no desenvolvimento das plântulas pode ser explicada considerando-se que o cajueiro é uma espécie adaptada às regiões de clima tropical e que a temperatura ótima para a sua germinação está em torno de 35°C (ROCCHETTI & PANERAI, 1968, citado por CAVALCANTI JUNIOR, 1994). Dessa forma, a mais baixa temperatura da sala de germinação (em média, 24°C) foi menos favorável para o processo germinativo das castanhas em relação àsquelas semeadas na casa de vegetação, onde a temperatura ambiente ficou, em média, próxima dos 29°C, sendo ainda maiores as diferenças entre as médias de temperaturas máximas na sala de germinação (aprox. 25°C) e na casa de vegetação (aprox. 35°C) (ver item 3.1 do Material e Métodos). Adicionalmente, a menor radiação fotossinteticamente ativa da sala de germinação ($42,6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) quando comparada com a da casa de vegetação ($1560 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), provavelmente retardou o desenvolvimento pós-germinativo das plântulas mantidas na sala de germinação ao limitar o processo fotossintético, indispensável para o crescimento das plantas (NAVARRO *et al.*, 2007).

Como pode ser observado na Figura 3, em condições controle (0 mM de NaCl), todos os parâmetros de crescimento analisados apresentaram maiores valores nas plântulas

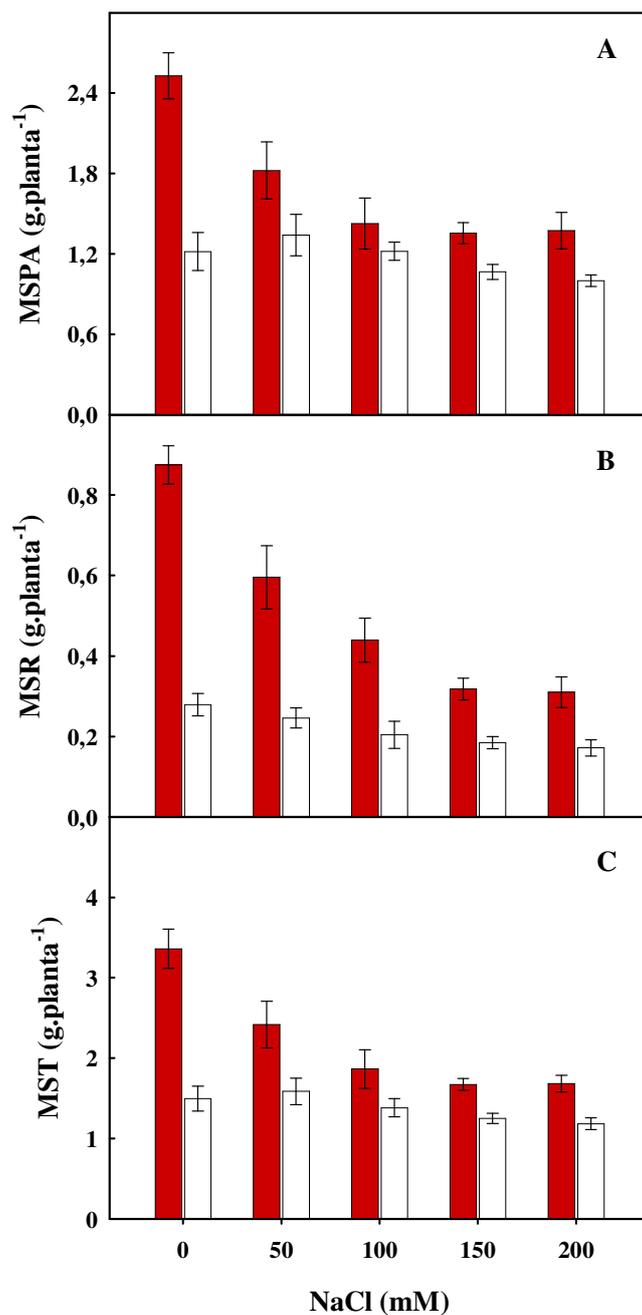


Figura 3. Matérias secas da parte aérea (A), das raízes (B) e total (C) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

cultivadas na casa de vegetação, mostrando que as plântulas de cajueiro se desenvolveram melhor nessas condições. Nas plântulas cultivadas em condições de casa de vegetação, as matérias secas da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST) foram 107, 211 e 124% maiores do que daquelas da sala de germinação, respectivamente. Contudo, em condições salinas, as maiores reduções nesses parâmetros foram observadas nas plântulas mantidas sob condições de casa de vegetação. Em uma concentração de NaCl de 50 mM, a MSPA foi reduzida em 28,1% enquanto que nos últimos níveis desse sal (100, 150 e 200 mM) a redução foi em média de 45,2% em relação ao controle (Figura 3A). Já na sala de germinação, a MSPA das plântulas de cajueiro não foi alterada significativamente pela salinidade até a dose de 150 mM de NaCl, sendo observada uma redução de 18% somente na dose mais elevada de sal (200 mM). Nas plântulas da casa de vegetação, a MSR foi drasticamente afetada pelo estresse salino, apresentando quedas em relação às plântulas controle de 31,0 e 49,4% em 50 e 100 mM de NaCl, respectivamente, e uma redução média de 63,8% nos dois últimos tratamentos (150 e 200 mM) (Figura 3B). Em contraste, a MSR das plântulas crescidas em sala de germinação sofreu uma redução de 28,6%, em relação ao controle, somente quando a concentração de NaCl foi aumentada para 100 mM, enquanto que nos dois últimos tratamentos (150 e 200 mM) a redução média foi de apenas 37,5% em relação as plântulas controle. Com relação à MST, as plântulas sob condições de casa de vegetação mostraram reduções em relação ao controle de 27,9 e 44,3%, respectivamente, em 50 e 100 mM de NaCl, enquanto que nesses mesmos níveis de salinidade a MST das plântulas crescidas na sala de germinação não foi alterada significativamente (Figura 3C). Nas doses de 150 e 200 mM, as reduções médias na MST foram de 50,1 e 18,6%, em relação ao controle, nas plântulas da casa de vegetação e da sala de germinação, respectivamente.

A redução na produção de biomassa em plantas sob condições de estresse salino é extensivamente relatada na literatura, sendo verificada em halófitas e especialmente em

glicófitas (FLOWERS *et al.*, 1977; GREENWAY & MUNNS, 1980). Chartzoulakis *et al.* (2002), estudando os efeitos da salinidade sobre o crescimento de seis cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.), verificaram reduções na produção de matéria seca total e no comprimento da parte aérea de todos eles. Reduções no crescimento e na produção de biomassa também têm sido observadas em outras espécies lenhosas, como *Eucalyptus camaldulensis* e *Dalbergia sissoo* (RAWAT & BANERJEE, 1998). Os efeitos negativos da salinidade sobre o crescimento das plantas estão associados às alterações em processos fisiológicos essenciais, como as taxas de assimilação de CO₂ e de respiração. Por outro lado, uma menor taxa de crescimento pode, também, está relacionada com o desvio do carbono de vias metabólicas essenciais para o crescimento para outros processos necessários à sobrevivência em ambientes salinos, tais como: ajustamento osmótico, síntese de solutos compatíveis, reparo de danos celulares e manutenção dos processos metabólicos básicos (BINZEL *et al.*, 1985).

As relações de matéria seca entre a parte aérea e as raízes (MSPA/MSR), tanto em condições controle quanto de estresse salino, foram maiores nas plântulas sob condições de sala de germinação do que naquelas crescidas em casa de vegetação (Figura 4A). Nas plântulas controle, crescidas na sala de germinação, a relação MSPA/MSR foi 48,5% maior do que as do controle cultivadas na casa de vegetação. A salinidade não afetou essa relação nas plântulas cultivadas em casa de vegetação até a dose de 100 mM de NaCl, sendo, no entanto, observados aumentos de 39,7 e 57,0% em 150 e 200 mM de NaCl, respectivamente. Nas plântulas da sala de germinação, o estresse salino também aumentou a relação MSPA/MSR, atingindo no tratamento com NaCl a 100 mM um aumento de 31,6% em relação ao controle, e mantendo-se com este mesmo valor até a dose de 200 mM de NaCl. Os aumentos da relação MSPA/MSR devem-se ao fato do crescimento da parte aérea ter sido menos afetado do que o crescimento do sistema radicular, em níveis mais elevados de salinidade (Figuras 3A e 3B). Esses resultados foram contrastantes com os observados para a

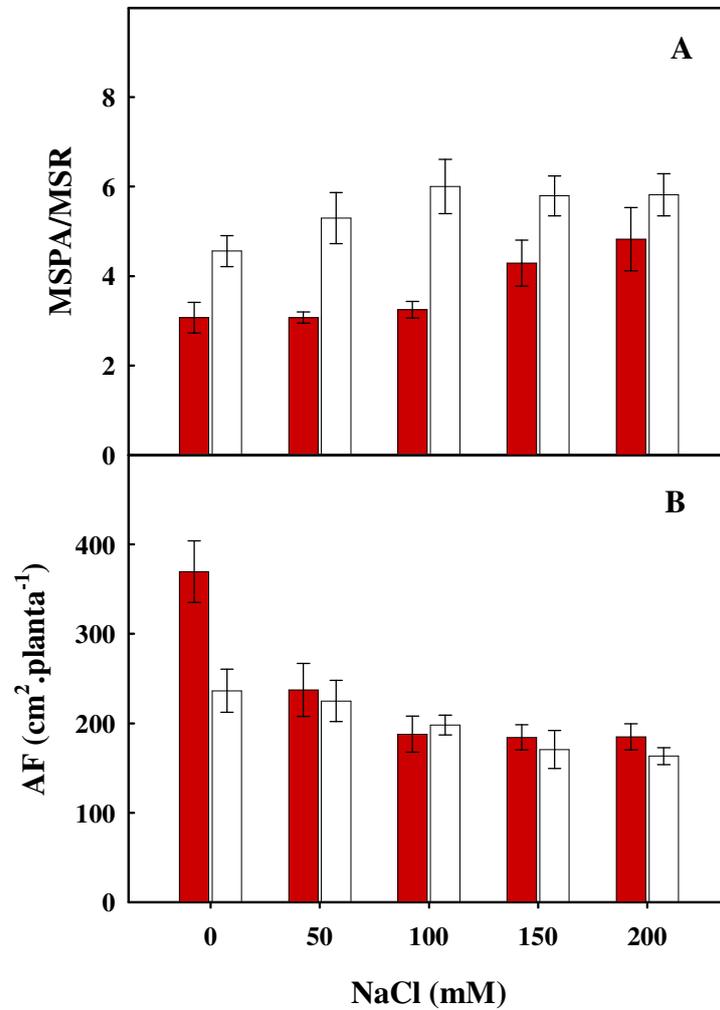


Figura 4. Relação de matéria seca da parte aérea pela das raízes (MSPA/MSR) (A) e área foliar (B) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

maioria das espécies vegetais, onde tem se verificado uma maior inibição do crescimento da parte aérea em relação ao das raízes, causada pela salinidade (MUNNS, 2002). Em plântulas de cajueiro anão-precoce, outros estudos mostram reduções na relação MSPA/MSR em condições de salinidade (VIÉGAS *et al.*, 2001; ABREU, 2004; ALVAREZ PIZARRO, 2006). Tais contradições podem ser resultado das diferentes abordagens empregadas nos experimentos (maneira como o estresse foi imposto, tempo de exposição ao estresse e estágio de desenvolvimento das plantas), bem como das diferentes condições ambientais em que as plantas foram cultivadas (YEO, 1999; BRAY *et al.*, 2000).

Em condições controle, a área foliar (AF) das plântulas crescidas em casa de vegetação foi 56,4% maior do que aquelas da sala de germinação (Figura 4B). Também, como observado para as MSPA e MSR (Figuras 3A e 3B), as maiores reduções nesse parâmetro, causadas pela salinidade, foram verificadas nas plântulas mantidas sob condições de casa de vegetação. Nestas condições, a AF das plântulas do tratamento com NaCl a 50 mM apresentou uma redução de 35,7%, em relação ao controle, atingindo a maior redução (49,2%) no tratamento com NaCl a 100 mM, e permanecendo com o mesmo valor nas duas últimas doses de NaCl (150 e 200 mM). Em condições de sala de germinação, a AF das plântulas foi reduzida pela salinidade somente nas doses de 100, 150 e 200 mM de NaCl, com reduções significativas de 16,2; 27,7 e 31,0%, respectivamente, em relação às plântulas do tratamento controle. Carneiro *et al.* (2002), mostraram que a área foliar de plantas de cajueiro anão-precoce era afetada negativamente pela salinidade mesmo em baixas concentrações de sais presentes na água de irrigação.

A redução da área foliar é um dos efeitos imediatos da salinidade sobre o crescimento das plantas (CHARTZOULAKIS *et al.*, 2002; PARIDA & DAS, 2005), sendo considerada uma resposta adaptativa para evitar a perda excessiva de água através da transpiração (GREENWAY & MUNNS, 1980; NEUMANN, 1997). Dessa forma, a sobrevivência da

planta seria mantida durante períodos de estresse pela maior eficiência no uso da água disponível no solo e pela redução na absorção de íons tóxicos. Contudo, tal estratégia também leva a uma redução na área foliar disponível para a fotossíntese e, conseqüentemente, na produção de biomassa pelo vegetal (PARIDA *et al.*, 2004). De acordo com Munns & Termaat (1986) a redução no crescimento foliar é inicialmente regulada por sinais hormonais, especialmente envolvendo o ácido abscísico (ABA), o qual é produzido nas raízes e transportado via xilema até as folhas. Posteriormente, a redução no crescimento foliar seria devido ao acúmulo excessivo de íons tóxicos nas folhas (KOZLOWSKI, 1997).

Os resultados das medidas de crescimento mostraram que as plântulas cultivadas na sala de germinação sofreram menos com o estresse salino quando comparadas àquelas da casa de vegetação. No entanto, é importante ressaltar que, em condições controle, o crescimento das plântulas da sala de germinação foi bem menor, fato que indica que essas plântulas se encontravam em condições ambientais desfavoráveis ao crescimento. Portanto, é provável que em função disso, as reduções no crescimento pela salinidade tenham se mostrado, nessas plantas, de forma menos atenuada que naquelas da casa de vegetação.

4.2- Trocas gasosas

A salinidade afetou negativamente as trocas gasosas das plântulas de cajueiro cultivadas tanto na casa de vegetação como na sala de germinação, sendo observadas reduções na fotossíntese líquida, na transpiração e na condutância estomática (Figura 5). Em condições controle, a fotossíntese líquida das plântulas mantidas em casa de vegetação foi 117% maior do que daquelas na sala de germinação (Figura 5A). No tratamento com 50 mM de NaCl na solução nutritiva, esse parâmetro foi reduzido em 47,5% nas plântulas sob condições de casa de vegetação. Em contraste, essa mesma dose de sal não causou alteração significativa na fotossíntese líquida das plântulas cultivadas na sala de germinação, as quais

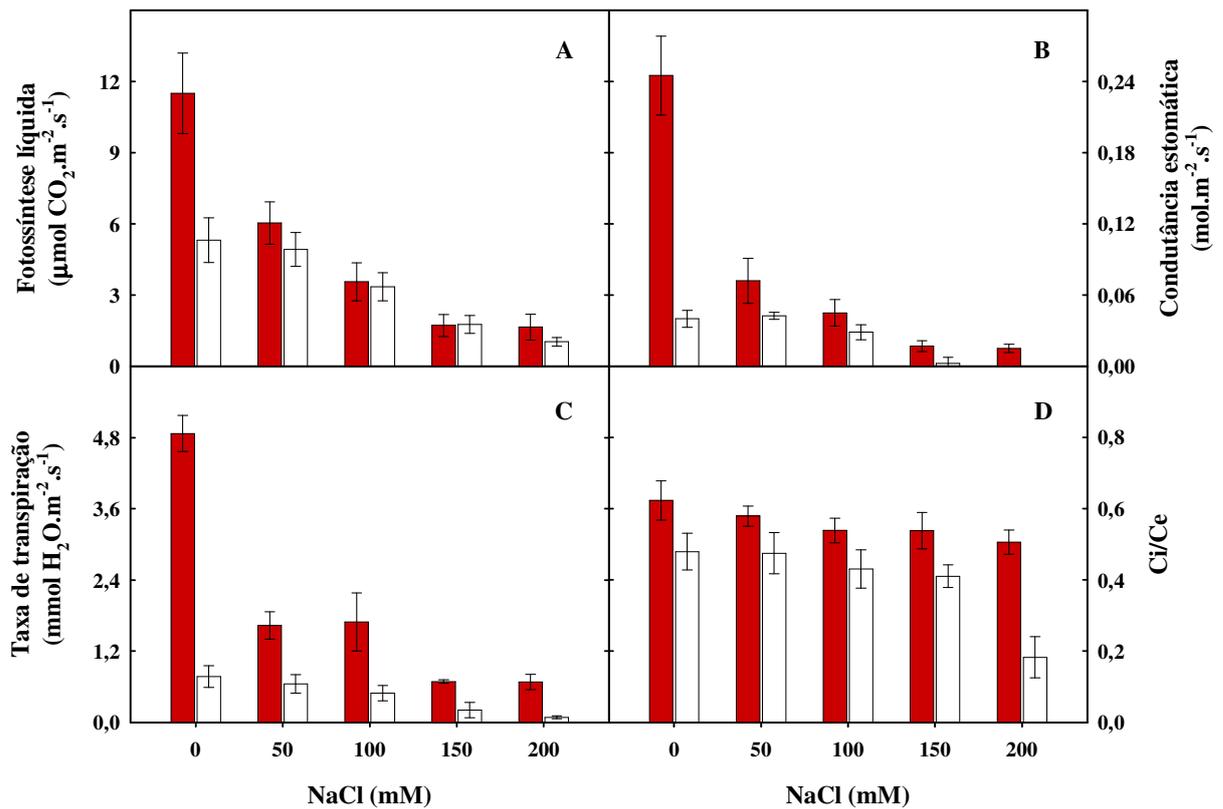


Figura 5. Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C) e relação entre a concentração de CO₂ interna e externa (Ci/Ce) (D) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

mostraram uma redução significativa de 36,7%, em relação ao controle, somente quando a concentração de NaCl foi aumentada para 100 mM. Nos dois últimos tratamentos salinos (NaCl a 150 e 200 mM) as reduções médias na fotossíntese líquida das plântulas da casa de vegetação e da sala de germinação foram de 85,3 e 73,7%, respectivamente, em relação aos controles. Os maiores decréscimos na fotossíntese líquida das plântulas na casa de vegetação corroboram com o fato delas também terem apresentado as maiores reduções no crescimento quando comparadas àquelas cultivadas em sala de germinação (Figuras 3 e 4). Em plantas jovens de cajueiro anão-precoce irrigadas com soluções salinas, Bezerra *et al.* (2005) também observaram reduções na fotossíntese líquida. Diversas árvores frutíferas sofrem reduções na suas taxas fotossintéticas quando submetidas à salinidade (DOWNTON, 1977; ZISKA *et al.*, 1990; TATTINI *et al.*, 1995), indicando que a fotossíntese é um fator limitante para o crescimento (NAVARRO *et al.*, 2007). Por outro lado, em baixas concentrações de sais, algumas espécies podem ter suas taxas fotossintéticas estimuladas (RAWAT & BANERJEE, 1998).

Em condições controle, a condutância estomática das plântulas mantidas em casa de vegetação foi 525% maior do que daquelas da sala de germinação (Figura 5B). Como se sabe, a luz é um dos fatores ambientais dominantes que controlam o movimento estomático (TAIZ & ZEIGER, 2004). Portanto, a maior condutância estomática observada nas plântulas mantidas em casa de vegetação deve-se, pelo menos em parte, à maior intensidade luminosa desse ambiente quando comparada com a da sala de germinação. Em adição, a maior condutância estomática das plântulas da casa de vegetação correlacionou-se com as maiores taxas fotossintéticas apresentadas por elas em relação às plântulas da sala de germinação (Figura 5A). Com relação aos efeitos do sal, na dose de 50 mM de NaCl, a condutância estomática foi reduzida em 72% nas plântulas da casa de vegetação. Em contraste, esse mesmo nível de salinidade não alterou significativamente a condutância estomática das

plântulas mantidas em sala de germinação, as quais mostraram uma redução significativa de 25%, em relação ao controle, somente quando a concentração de NaCl foi aumentada para 100 mM. Nos dois últimos tratamentos salinos (NaCl a 150 e 200 mM) a condutância estomática das plântulas da casa de vegetação sofreu uma redução média de 92% em relação ao tratamento controle, enquanto que as plântulas da sala de germinação não mostraram valores mensuráveis de condutância estomática (Figura 5B). A incapacidade de fechar os estômatos em condições de salinidade tem sido proposta como uma importante razão para a sensibilidade de algumas plantas ao estresse salino, pois o fechamento dos estômatos contribui para a eficiência no uso da água em situações de baixa disponibilidade hídrica (ROBINSON *et al.*, 1997). No entanto, este mecanismo limita a absorção de CO₂ do ambiente e, conseqüentemente, a fotossíntese líquida (ROMERO-ARANDA *et al.*, 2001).

Como conseqüência da redução na condutância estomática, a taxa de transpiração das plântulas estressadas foi também significativamente reduzida (Figura 5C). É interessante ressaltar que, em condições controle, a transpiração das plântulas mantidas em casa de vegetação foi 532% maior do que daquelas da sala de germinação. Além de atuarem sobre o comportamento estomático, fatores ambientais como a luz, a umidade relativa do ar, a temperatura e o vento podem influenciar diretamente a perda de água por transpiração (ANGELOCCI, 2002). Embora os valores médios de umidade relativa do ar não tenham diferido significativamente entre as duas condições ambientais empregadas, é provável que, em função dos maiores valores de temperatura e de energia radiante, a demanda evaporativa do ar tenha sido maior na casa de vegetação do que na sala de germinação. Dessa forma, as maiores taxas de transpiração das plântulas cultivadas em casa de vegetação podem ser explicadas pelo fato de que, nestas condições, a demanda evaporativa do ar foi maior. Na dose de 50 mM de NaCl, a transpiração foi reduzida em 66,5% nas plântulas da casa de vegetação. Em contraste, essa mesma dose de sal não alterou significativamente a transpiração das

plântulas da sala de germinação, as quais mostraram uma redução significativa de 36,4%, em relação ao controle, somente quando a concentração de NaCl foi aumentada para 100 mM (Figura 5C). Nos dois últimos tratamentos salinos (150 e 200 mM) as reduções médias na transpiração das plântulas da casa de vegetação e da sala de germinação foram de 85,9 e 80,5%, respectivamente em relação aos controles. Estes resultados mostram que as plântulas de cajueiro são bastante eficientes na restrição da perda de água pela transpiração e sugerem uma adaptação da espécie a ambientes secos (SOUZA *et al.*, 2005).

As reduções na fotossíntese líquida e na condutância estomática foram acompanhadas por uma gradual e pequena redução da relação entre a concentração de CO₂ interna e externa (C_i/C_e) nas plântulas da casa de vegetação, atingindo no último tratamento um valor 17,7% inferior ao das plântulas controle (Figura 5D). Nas plântulas da sala de germinação, a relação C_i/C_e não foi afetada significativamente pela salinidade até a dose de 150 mM de NaCl, mas na dose mais elevada de sal (200 mM) sofreu uma redução de 62,5%, em relação ao controle. Embora a relação C_i/C_e tenha diminuído em ambas as condições de crescimento, as reduções observadas não justificam completamente os grandes decréscimos na fotossíntese líquida. Portanto, tais resultados sugerem a participação de fatores não-estomáticos na redução das taxas fotossintéticas em condições de salinidade. A mesma suposição foi tirada por Alvarez Pizarro (2006) que não observou mudanças significativas deste parâmetro em cinco clones de cajueiro anão-precoce estudados sob condições de estresse salino.

A influência das condições ambientais empregadas sobre as trocas gasosas das plântulas de cajueiro é destacada quando se analisa a eficiência no uso da água (EUA) pelas folhas (Figura 6). Em condições de casa de vegetação, as plântulas de cajueiro não apresentaram alterações nos valores de EUA pela salinidade, a qual permaneceu com valores próximos ao das plântulas controle, em torno de 2,3 μmol de CO₂ por mmol de H₂O transpirada. Já em condições de sala de germinação, a perda de água por μmol de CO₂ fixado

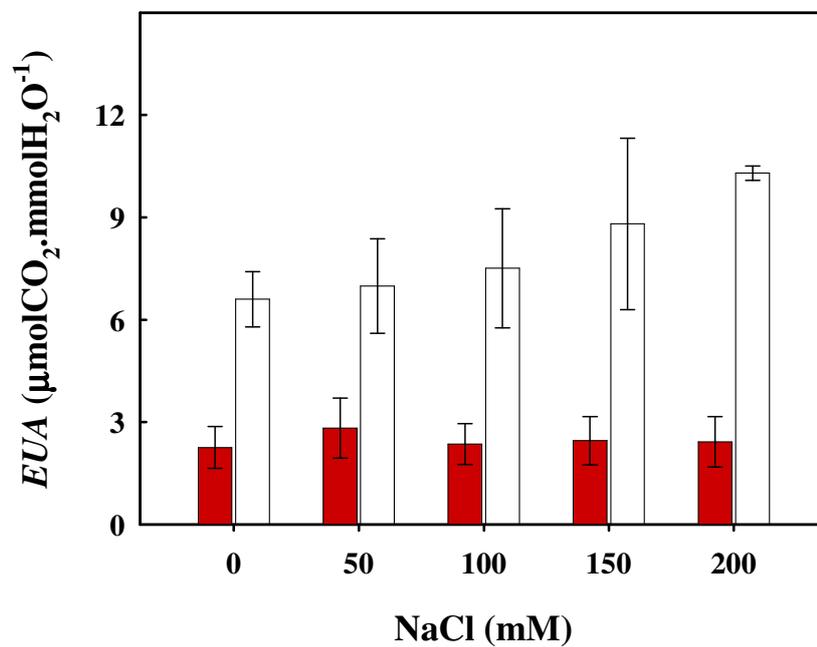


Figura 6. Eficiência no uso da água em plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

foi muito menor. As plântulas controle apresentaram o valor de *EUA* de 6,6 μmol de CO_2 por mmol de H_2O o qual, após a adição de sal, apresentou um aumento de 56% no tratamento com NaCl a 200 mM. Provavelmente, isto só foi possível devido ao fechamento dos estômatos e à menor demanda evaporativa do ar na sala de germinação. [Backhausen et al. \(2005\)](#), estudando os efeitos da salinidade em plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) sob condições de baixa (60%) e de alta (85%) umidade relativa do ar, verificaram um maior valor em *EUA* nas plantas sob condições de alta umidade (baixa demanda evaporativa do ar).

4.3- Conteúdo de clorofila

Os resultados dos teores de clorofilas *a*, *b* e *total*, bem como os valores da relação entre os teores de clorofilas *a* e *b* (clf *a/b*) nas folhas das plântulas de cajueiro anão-precoce são apresentados na [Figura 7](#). Verifica-se que as condições ambientais de cultivo das plântulas tiveram bastante influência sobre os teores foliares de clorofila, sendo que em condições controle as quantidades de clorofilas *a*, *b* e *total* nas plântulas crescidas em sala de germinação foram, respectivamente, 74,2, 93,1 e 79,1% maiores do que aquelas da casa de vegetação e permaneceram superiores mesmo em altas doses de sal ([Figuras 7A, 7B e 7C](#)). Esses resultados sugerem um possível mecanismo de aclimação das plântulas da sala de germinação para maximizar a absorção de luz em condições de baixa luminosidade, já que a radiação fotossinteticamente ativa da sala de germinação foi, aproximadamente, 36 vezes menor do que aquela da casa de vegetação. Em laranjeira, a redução da radiação fotossinteticamente ativa em 50% causou um aumento no conteúdo de clorofila das folhas ([GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2006](#)).

Os teores de clorofila *a* nas plântulas da sala de germinação foram reduzidos somente nos tratamentos com NaCl a 150 e 200 mM, apresentando nesta última dose de sal uma redução de 29,8%, em relação ao controle ([Figura 7A](#)). Contudo, reduções dessa magnitude

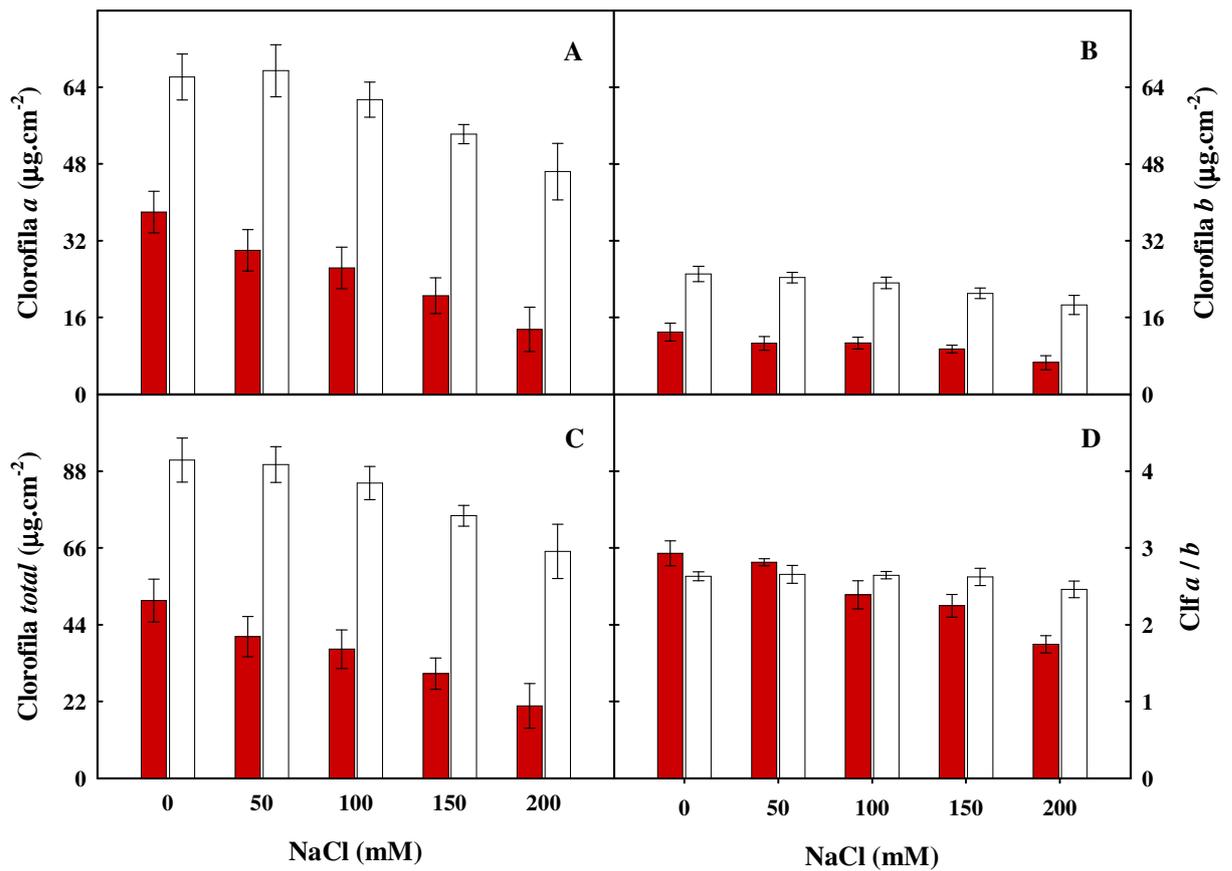


Figura 7. Teores foliares de clorofilas *a* (A), *b* (B), *total* (C) e relação clorofila *a* / clorofila *b* (D) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

no teor de clorofila *a* foram observadas nas plântulas da casa de vegetação estressadas com 100 mM de NaCl, onde apresentaram um queda de 30,7% em relação ao controle, enquanto que na dose mais elevada de NaCl (200 mM) a redução foi de 64,4%. Da mesma forma, as plântulas mantidas na casa de vegetação também sofreram as maiores reduções no conteúdo de clorofila *b*, atingindo em 200 mM de NaCl um valor 49,1% menor do que o controle, enquanto que nesse mesmo nível de salinidade as plântulas da sala de germinação sofreram uma redução de 25,8% em relação ao controle (Figura 7B). Os teores de clorofila *total* nas plântulas da sala de germinação caiu com a salinidade apenas nas doses de 150 e 200 mM de NaCl, alcançando nesta última concentração uma redução de 23,7% em relação às plântulas controle (Figura 7C). Diferentemente, as plântulas da casa de vegetação sofreram reduções mais acentuadas nos teores de clorofila *total*, apresentando na última dose de NaCl uma queda de 59,3% em relação ao controle. A relação entre os teores de clorofilas *a* e *b* praticamente não foi afetada pela salinidade nas plântulas crescidas na sala de germinação até a concentração de 200 mM de NaCl, quando apresentou uma pequena redução de 6,5%, em relação ao controle. Entretanto, nas plântulas cultivadas na casa de vegetação, as reduções nesse parâmetro foram de 18,4, 23,2 e 40,6% nos tratamentos com NaCl a 100, 150 e 200 mM, respectivamente (Figura 7D).

Vários trabalhos relatam diminuições nos teores de clorofila tanto em glicófitas como em halófitas após exposição ao sal (PETOLINO & LEONE, 1980; CHAVAN & KARADGE, 1986; GARG & SINGLA, 2004; PARIDA *et al.*, 2004). Levando-se em consideração que as clorofilas são pigmentos essenciais para o processo de captura da luz, necessária para a fotossíntese, as maiores reduções nos teores de clorofila das plântulas da casa de vegetação são consistentes com o fato delas também terem apresentado os maiores decréscimos na taxa fotossintética (Figura 5A). Entretanto, outros estudos com árvores frutíferas sob estresse salino não mostraram essa mesma relação (RAWAT & BANERJEE, 1998).

Os teores relativos de clorofila total, expressos pelas leituras obtidas com o medidor portátil de clorofila, SPAD-502, são apresentados na [Figura 8](#). Como pode ser observado, um maior conteúdo relativo de clorofila foi detectado nas plântulas crescidas em sala de germinação, tanto em condições controle quanto de estresse salino, resultado semelhante àquele mostrado na [Figura 7](#). Nessas plântulas, o teor relativo de clorofila caiu com o aumento da salinidade somente nas doses de 150 e 200 mM de NaCl, alcançando neste último tratamento uma redução de 20,3% em relação às plântulas controle. Já as plântulas cultivadas sob condições de casa de vegetação apresentaram maiores reduções nos teores relativos de clorofila com o estresse salino, atingindo uma queda de 41,7%, em relação ao controle, no tratamento com NaCl a 200 mM ([Figura 8](#)).

Comparando-se os valores das leituras obtidas com o medidor portátil de clorofila com os dos teores de clorofilas *a*, *b* e *total* estimados segundo [Arnon \(1949\)](#), tanto nas plântulas da casa de vegetação quanto nas da sala de germinação, observou-se uma correlação positiva e estatisticamente significativa ([Figura 9](#)). Tais resultados corroboram com os obtidos por [Neves et al. \(2005\)](#) para algodoeiro herbáceo, que mostraram que as estimativas de clorofila com o medidor portátil SPAD-502 podem substituir, com boa precisão, as determinações tradicionais do teor de clorofila, pelo menos em estudos comparativos envolvendo esse pigmento fotossintético.

De acordo com alguns autores, a severidade dos sintomas de danos nas folhas está, geralmente, relacionada com o acúmulo de elevadas concentrações de íons na parte aérea ([AKTAS et al., 2006](#); [EKER et al., 2006](#)). Portanto, é possível que os efeitos da salinidade sobre os teores de clorofila ([Figuras 7 e 8](#)), que foram mais conspícuos nas plântulas cultivadas na casa de vegetação, devam-se ao fato dessas plântulas, nessas condições de cultivo, terem acumulado maiores quantidades de íons em suas folhas. Em apoio a essa idéia,

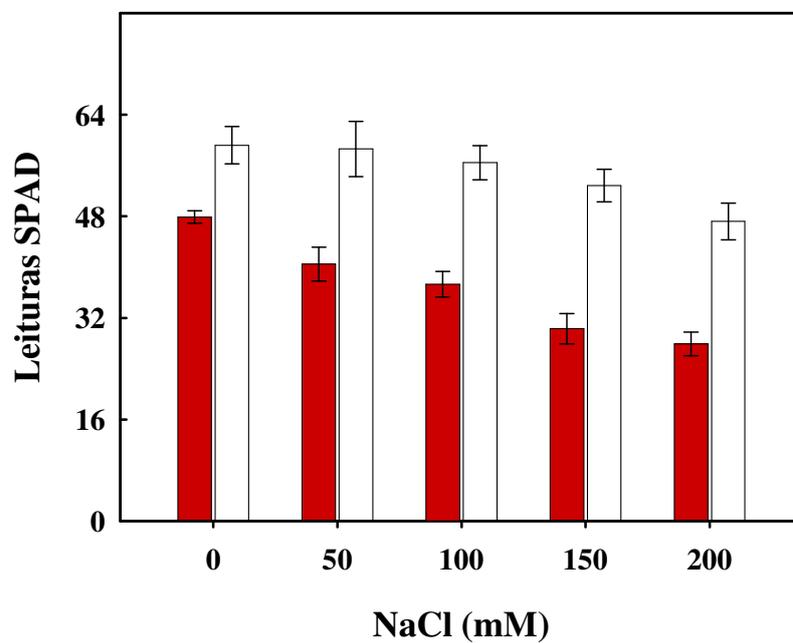


Figura 8. Teores relativos de clorofila, medidas com o medidor portátil de clorofila (SPAD-502), de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

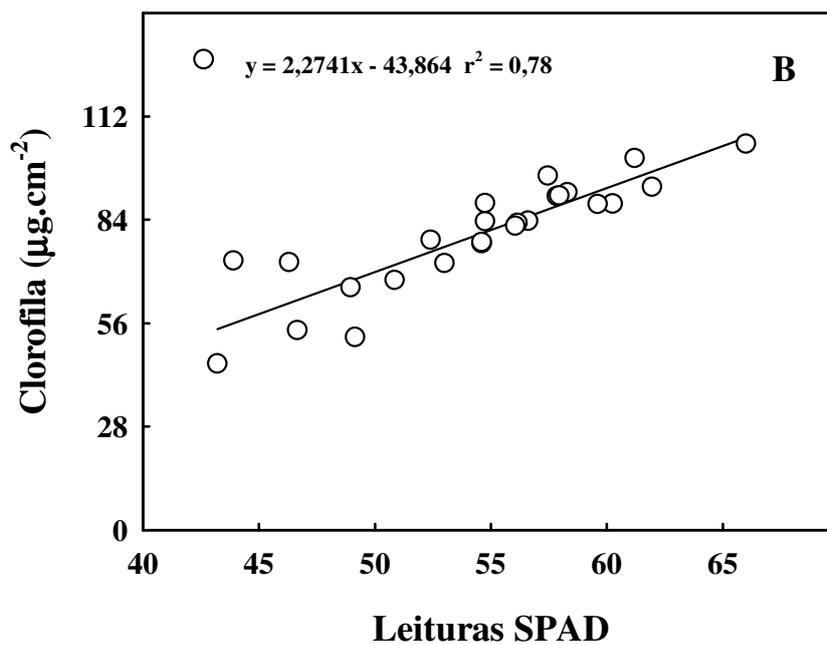
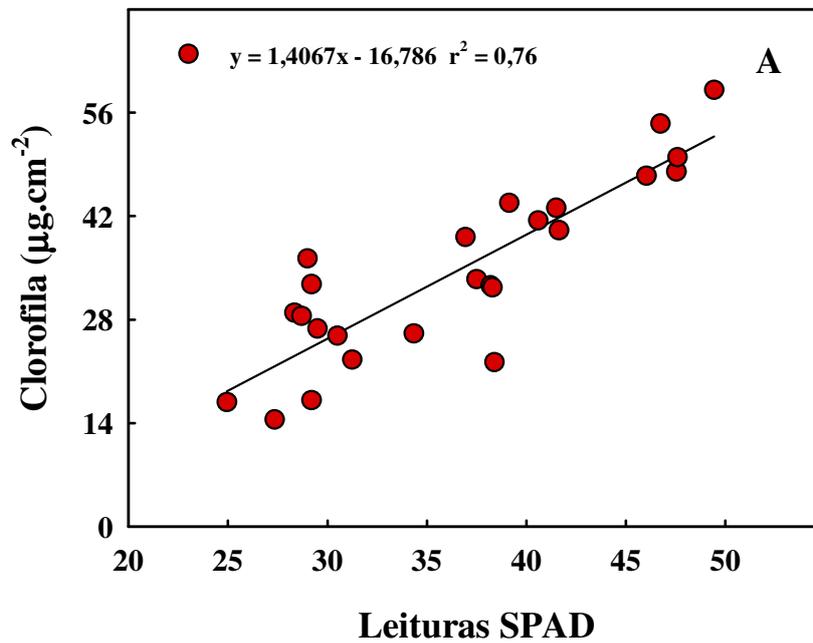


Figura 9. Correlação entre as leituras feitas com o SPAD-502 e os teores foliares de clorofila *total*, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (A) e de sala de germinação (B). *Significativo a 1% de probabilidade pelo teste *F*.

foram visualizados, em algumas plântulas da casa de vegetação, sintomas de clorose e zonas necróticas (Figura 10), mas não naquelas cultivadas na sala de germinação.

4.4- Potencial osmótico

Os efeitos da salinidade sobre o potencial osmótico foliar (Ψ_s) das plântulas de cajueiro anão-precoce são apresentados na Figura 11. Tanto em condições controle quanto de estresse salino, as plântulas cultivadas na casa de vegetação apresentaram os valores mais negativos e as maiores reduções em Ψ_s . No nível de salinidade de 50 mM de NaCl, o Ψ_s dessas plântulas sofreu uma redução de 47%, em relação ao controle, atingindo na dose de 100 mM de NaCl o valor mais baixo, o qual correspondeu a uma redução de 73,5%, permanecendo praticamente com este valor até a dose de sal mais elevada (200 mM). Já na sala de germinação, a redução no Ψ_s ocorreu de forma menos acentuada nas plântulas estressadas. No tratamento com 50 mM de NaCl a redução do Ψ_s foi de apenas 18,7%, enquanto que naquelas estressadas com esse sal nas concentrações de 100, 150 e 200 mM as reduções foram semelhantes e, em média, de 41,4% em relação ao controle. A redução no Ψ_s celular tem sido considerada um importante mecanismo de aclimação das plantas às condições de seca ou de salinidade (RODRÍGUEZ *et al.*, 1997; KHAN *et al.*, 2000; CHAVES-FILHO & STACCIARINI-SERAPHIN, 2001; ROMERO-ARANDA *et al.*, 2001; KOYRO, 2006; NAVARRO *et al.*, 2007), por contribuir para a manutenção do gradiente de potencial hídrico favorável à absorção de água e a turgescência celular. Esse ajuste osmótico é resultado do acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos nos tecidos vegetais (ASHRAF & HARRIS, 2004). Portanto, as maiores reduções do Ψ_s das plântulas de cajueiro sob condições de casa de vegetação sugerem que estas acumularam uma maior quantidade desses solutos nos tecidos foliares do que as plântulas cultivadas na sala de germinação.



Figura 10. Sintomas de clorose e de zonas necróticas nas folhas das plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em casa de vegetação.

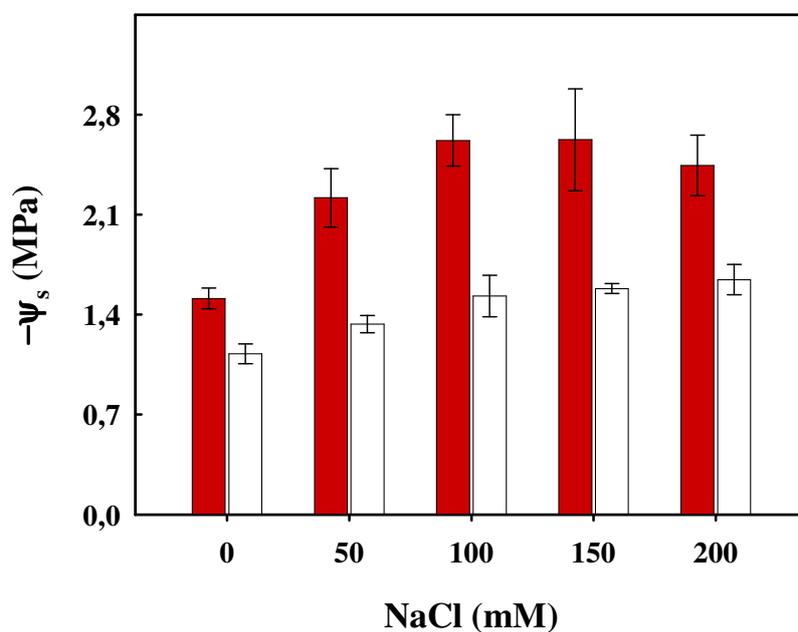


Figura 11. Potencial osmótico foliar de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

4.5- Solutos inorgânicos

4.5.1- Teores de sódio e cloreto

O estresse salino causou um aumento nos teores de Na^+ nas folhas e nas raízes das plântulas de cajueiro, tanto em condições de casa de vegetação quanto em sala de germinação (Figura 12). É interessante ressaltar que, em condições controle, os teores de Na^+ nos órgãos estudados, não diferiram significativamente entre as plântulas da casa de vegetação e aquelas da sala de germinação. Contudo, com a aplicação do estresse salino, as quantidades e a forma de acumulação desse íon foram dependentes das condições de cultivo empregadas e do órgão vegetal estudado. Nas plântulas crescidas em casa de vegetação e estressadas com 50 mM de NaCl, o aumento no teor de Na^+ nas folhas foi de 650%, em relação ao controle, e de 768%, em média, nos três últimos níveis de sal (100, 150 e 200 mM) (Figura 12A). Já nas plântulas da sala de germinação, o teor de Na^+ nas folhas atingiu o valor máximo no tratamento de 50 mM (216% maior, em relação ao controle) e permaneceu com este mesmo valor até o tratamento com NaCl a 200 mM. Os teores de Na^+ nas folhas e nas raízes das plântulas da casa de vegetação foram, em média, 179 e 44,2% maiores do que naquelas da sala de germinação, respectivamente (Figura 12).

Ao contrário do que foi observado nas folhas, os teores de Na^+ nas raízes aumentaram progressivamente com o aumento da salinidade até a dose de sal mais elevada (Figura 12B). Nas plântulas da casa de vegetação, os aumentos nos teores desse íon foram de 424, 634, 960 e 1130% nos tratamentos com NaCl a 50, 100, 150 e 200 mM, respectivamente. Já nas plântulas da sala de germinação, os incrementos nos teores de Na^+ das raízes, em relação ao controle, foram de 297, 474, 726 e 1003% nos tratamentos de 50, 100, 150 e 200 mM, respectivamente.

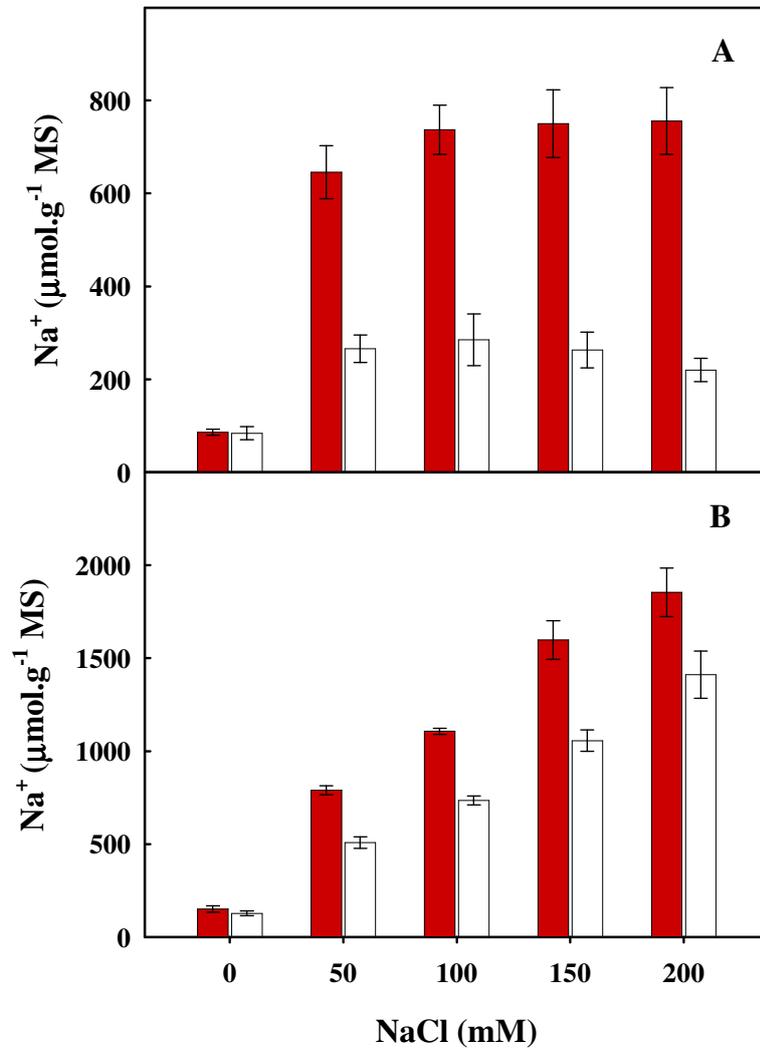


Figura 12. Teores de sódio nas folhas (A) e nas raízes (B) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

Tanto em condições controle, como de estresse salino e em ambas as condições ambientais, os teores de Cl^- nas folhas (Figura 13A) apresentaram comportamento semelhante ao observado para os do íon Na^+ (Figura 12A), inclusive com valores quantitativos muito parecidos. Também, nas raízes, o comportamento nos teores de Cl^- (Figura 13B) foi idêntico àquele do íon Na^+ (Figura 12B), tanto em condições controle como de estresse salino, quer em plântulas crescendo em casa de vegetação como em sala de germinação. No entanto, os teores de Cl^- , para as plântulas crescendo na casa de vegetação e em doses elevadas de sais (150 e 200 mM), foram um pouco menores que aqueles observados para o Na^+ nas mesmas condições.

Como se sabe, a transpiração está diretamente relacionada com as taxas de absorção e transporte de íons para as folhas. Dessa forma, os maiores acúmulos de Na^+ e Cl^- nas plântulas da casa de vegetação podem estar relacionados às maiores taxas transpiratórias destas em relação as plântulas que foram cultivadas na sala de germinação (Figura 5C). Em plantas de batata, os danos causados pelo estresse salino foram aumentados em condições de alta intensidade luminosa e de baixa umidade relativa do ar, as quais aceleraram as taxas transpiratórias e, conseqüentemente, a acumulação de sais nos tecidos vegetais (BACKHAUSEN *et al.*, 2005). Portanto, tais resultados indicam que tanto a transpiração quanto os fatores ambientais que a influenciam, são cruciais para o grau de tolerância alcançado pelas plantas (SALIM, 1989). No presente trabalho, as plântulas cultivadas em condições de casa de vegetação foram as que apresentaram as maiores reduções no crescimento (Figuras 3 e 4), nos parâmetros de trocas gasosas (Figura 5) e nos teores de clorofila (Figura 7), resultados que são concordantes com os maiores acúmulos de íons tóxicos nos tecidos dessas plântulas, em relação àquelas da sala de germinação.

O maior acúmulo dos íons tóxicos, Na^+ e Cl^- , nas folhas das plântulas crescidas na casa de vegetação (Figuras 12A e 13A) foi concordante com o fato do Ψ_s dessas plântulas ter

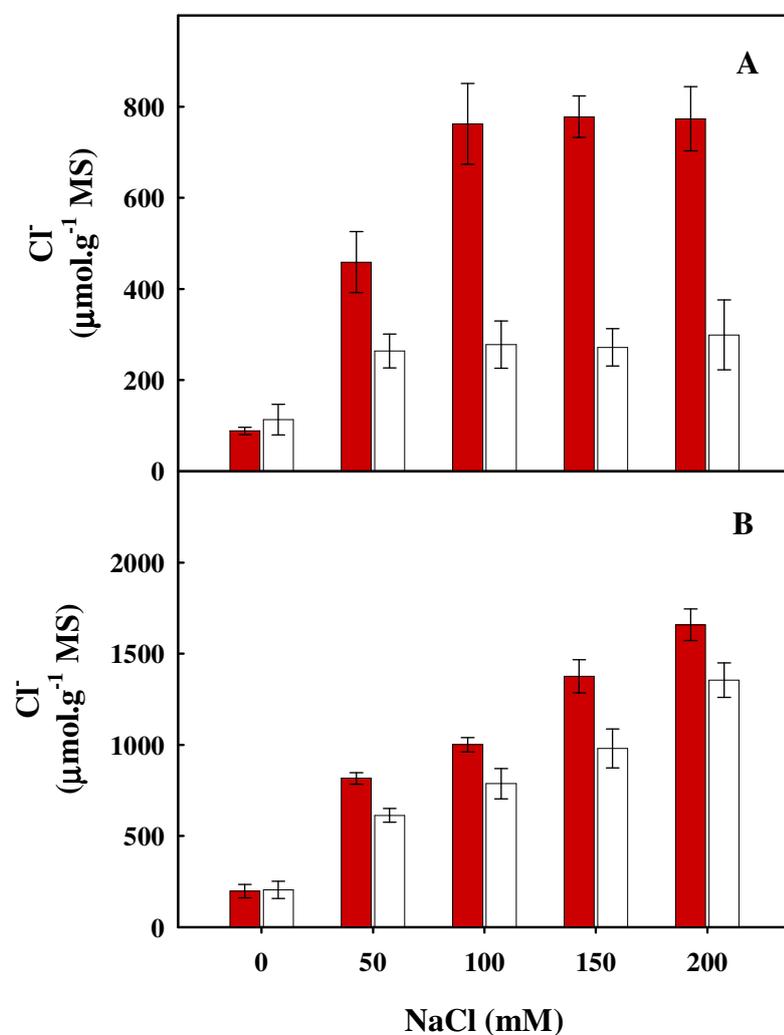


Figura 13. Teores de cloreto nas folhas (A) e nas raízes (B) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

apresentado, também, as maiores reduções pela salinidade (Figura 11). Embora um ajustamento osmótico capaz de manter a turgescência celular possa ser alcançado pelo acúmulo de íons inorgânicos (GHOULAM *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ *et al.*, 2005), a baixa eficiência de compartimentalização desses íons tóxicos no vacúolo pode ter sido a principal razão para as maiores inibições do crescimento foliar, bem como pelas maiores reduções nos teores de clorofila e, conseqüentemente, nas taxas de fotossíntese líquida observadas aqui nas plântulas de cajueiro anão-precoce cultivadas em condições de casa de vegetação. A comparação dos efeitos da salinidade em *Arabidopsis thaliana* (glicófita) e *Thellungiella halophila* (halófita) mostrou que, apesar do grande acúmulo de Na⁺ e Cl⁻ nas folhas de *T. halophila*, a hidratação dos tecidos, o conteúdo de clorofila e a atividade fotossintética permaneceram intactas, indicando um eficiente mecanismo de compartimentalização dos íons (M'RAH *et al.*, 2006).

Em ambas as condições ambientais, o aumento da concentração de NaCl na solução nutritiva para 150 e 200 mM não alterou os níveis de Na⁺ e de Cl⁻ nas folhas em relação ao tratamento anterior, NaCl a 100 mM (Figuras 12A e 13A). Esta mesma tendência de estabilização dos níveis desses íons nas folhas também foi observada por Abreu (2004), e pode ser resultado da ação isolada ou combinada de um dos seguintes mecanismos: redução do fluxo transpiratório no xilema; retenção dos íons em outros órgãos (ex. raízes e caules) e diminuição da velocidade de carregamento dos íons no xilema (MUNNS, 2002; TESTER & DAVENPORT, 2003). De forma diferente, as raízes das plântulas de cajueiro sob condições salinas não mostraram essa mesma tendência de estabilização dos níveis iônicos, mostrando que elas não foram capazes de regular as taxas de absorção de Na⁺ e de Cl⁻. Essa baixa seletividade para a absorção de íons permitiu que eles se acumulassem em níveis que excederam a capacidade de compartimentalização vacuolar e, dessa forma, inibiram severamente o crescimento radicular. Para muitas glicófitas, a sensibilidade aos sais está

geralmente relacionada com a absorção e/ou o transporte de excessivas quantidades de íons para as partes aéreas (GREENWAY & MUNNS, 1980). Um dos mecanismos propostos para excluir os sais das folhas envolve a retenção desses íons no sistema radicular (MUNNS, 2002). Por exemplo, em algumas espécies do gênero *Eucalyptus*, a tolerância ao sal foi relacionada com o menor acúmulo de íons na parte aérea comparada às raízes (MORABITO *et al.*, 1996). De fato, em ambas as condições ambientais aqui empregadas, verificou-se que o maior acúmulo de Na^+ e Cl^- ocorreu nas raízes das plântulas de cajueiro (Figuras 12B e 13B). Contudo, o crescimento desse órgão foi mais afetado do que o da parte aérea (Figura 3), sugerindo que as raízes não seqüestraram esses íons tóxicos de maneira eficiente no vacúolo.

4.5.2- Teores de potássio

Os tratamentos salinos aplicados tiveram pouco efeito sobre os teores foliares de K^+ das plântulas de cajueiro anão-precoce (Figura 14A). Como pode ser observado, nas plântulas cultivadas em casa de vegetação o conteúdo de K^+ sofreu pequenas alterações, com redução média de 13,3%, em relação ao controle, apenas nos tratamentos com 50 e 100 mM de NaCl. Também, nas folhas das plântulas estressadas e crescidas na sala de germinação, as alterações foram pequenas, sendo observada uma redução média no teor de K^+ de cerca de 11,3% em relação ao controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Abreu (2004) e Alvarez Pizarro (2006), os quais não observaram reduções significativas nos teores de K^+ nas folhas do mesmo clone de cajueiro anão-precoce aqui estudado. Também, é interessante ressaltar que, embora as plântulas crescidas na casa de vegetação tenham acumulado uma maior quantidade de Na^+ e Cl^- nas folhas, em relação àquelas da sala de germinação (Figuras 12A e 13A), os teores de K^+ nesses órgãos não diferiram muito entre as duas condições de cultivo empregadas. Portanto, os resultados sugerem que as plântulas de cajueiro anão-precoce são capazes de manter as concentrações de K^+ nas folhas, as quais podem contribuir tanto para o

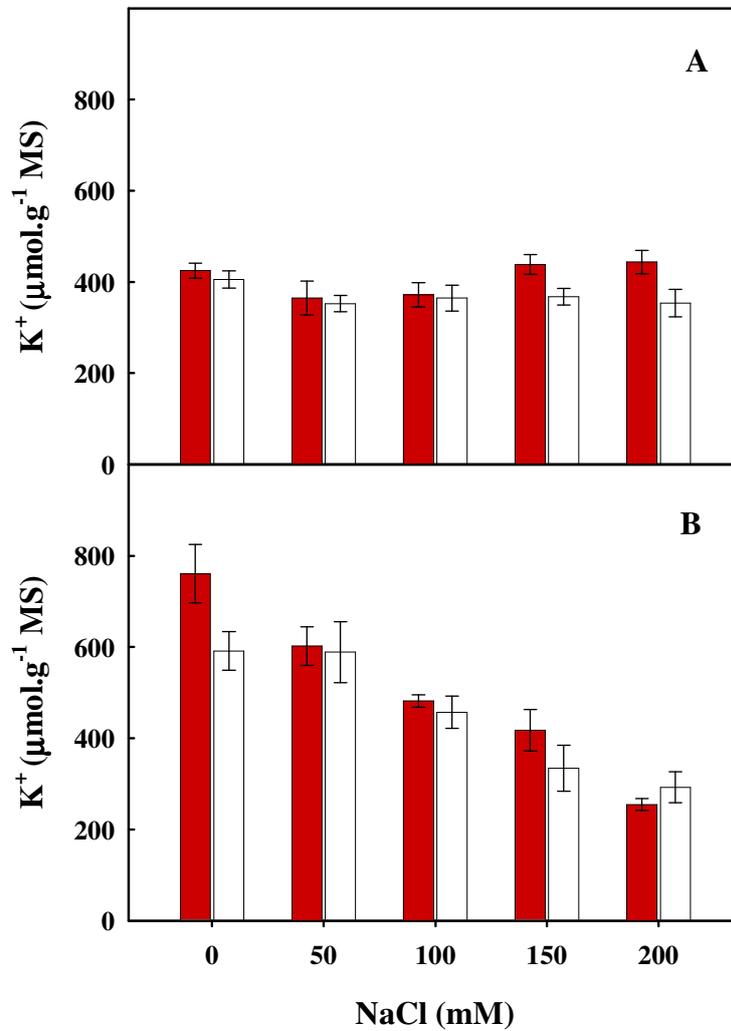


Figura 14. Teores de potássio nas folhas (A) e nas raízes (B) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

ajustamento osmótico quanto para a manutenção do movimento estomático sob condições de estresse salino (BRAG, 1972; MAATHUIS & AMTMANN, 1999).

De forma diferente do observado nas folhas, a salinidade afetou significativamente os teores de K^+ nas raízes (Figura 14B). Em condições de casa de vegetação, os teores de K^+ decresceram progressivamente com o aumento da salinidade, atingindo na dose mais elevada (200 mM) um valor 66,5% menor que aquele em condições controle. Nas plântulas cultivadas em sala de germinação, os teores de K^+ também foram reduzidos pela salinidade, porém, somente a partir da concentração de 100 mM de NaCl, atingindo na mais alta dose de sal um valor 50,5% menor que aquele do controle (Figura 14B). Em árvores de tangerina (*Citrus reticulata*), um estresse salino de longa duração (90 dias) também causou uma diminuição nas concentrações de K^+ nas raízes (CÁMARA-ZAPATA *et al.*, 2004). Possivelmente, a redução nos teores de K^+ deve-se à exposição direta das raízes ao sal o que provoca alterações na integridade e permeabilidade seletiva da membrana plasmática ao K^+ (GRATTAN & GRIEVE, 1999; MANSOUR & SALAMA, 2004). Isto se deve às similaridades físico-químicas dos íons Na^+ e K^+ , que fazem com que os transportadores de K^+ possam ser utilizados para a absorção de Na^+ quando este se encontra em excesso no meio de crescimento, o que pode resultar em deficiência de K^+ (MAATHUIS & AMTMANN, 1999). Adicionalmente, tem sido sugerido que o efluxo de K^+ provocado pelo acúmulo excessivo de Na^+ na zona radicular é resultante do deslocamento do Ca^{2+} das membranas (CRAMER *et al.*, 1985).

4.5.3- Relação Na^+/K^+

A salinidade causou um aumento da relação Na^+/K^+ tanto nas folhas quanto nas raízes das plântulas de cajueiro anão-precoce, sendo os maiores incrementos observados nas plântulas crescidas sob condições de casa de vegetação (Figura 15). O aumento da relação

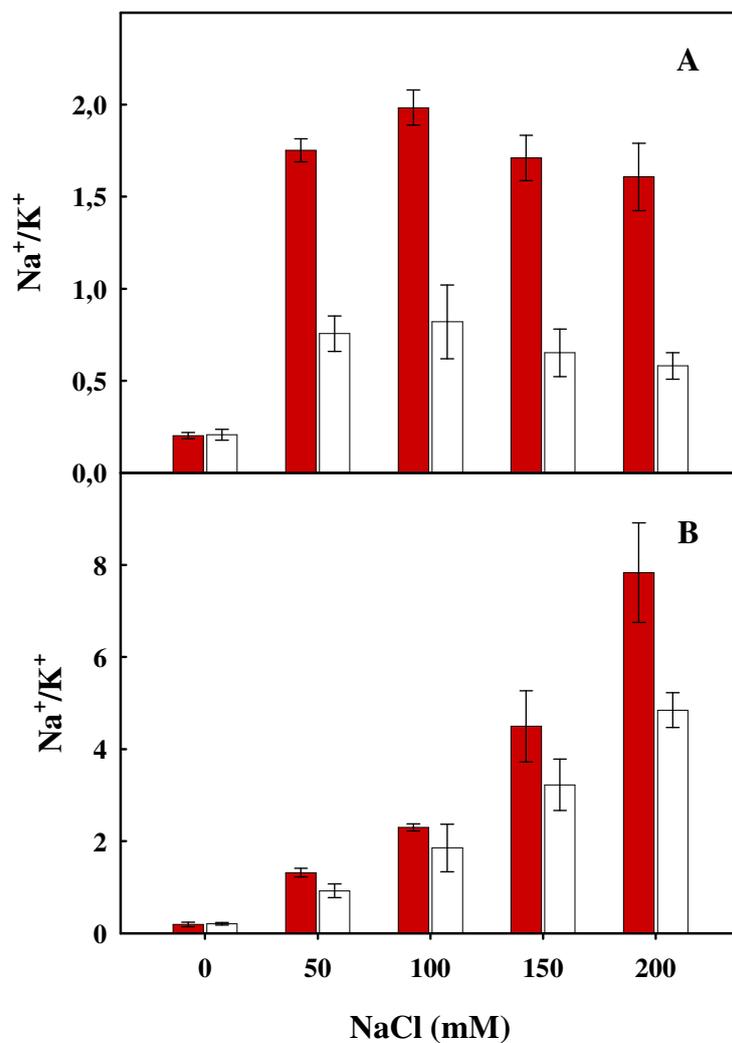


Figura 15. Relação entre os teores de sódio e de potássio nas folhas (A) e nas raízes (B) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

Na^+/K^+ , em relação ao controle, nas folhas das plântulas estressadas foi, em média, de 239% nas condições de sala de germinação e de 769% nas condições de casa de vegetação (Figura 15A). Nas raízes, esta relação também aumentou com a intensificação do estresse salino, sendo observado nas plântulas da casa de vegetação aumentos de 589, 1104, 2254 e 4001%, em relação ao controle, nos tratamentos de 50, 100, 150 e 200 mM, respectivamente (Figura 15B). Já nas plântulas da sala de germinação a relação Na^+/K^+ nas raízes aumentou 345, 795, 1456 e 2241% nos tratamentos de 50, 100, 150 e 200 mM, respectivamente. No citosol, o K^+ é essencial para a atividade de várias enzimas, de modo que, a toxicidade metabólica do Na^+ está geralmente relacionada com a sua capacidade de competir com o K^+ por estes sítios de ligação (MAATHUIS, 2006). Dessa forma, altos níveis de Na^+ ou altas taxas Na^+/K^+ prejudicam as funções bioquímicas celulares e retardam o crescimento das plantas. Como consequência dos maiores aumentos nos teores de Na^+ e dos decréscimos nos teores de K^+ pelos tratamentos salinos, as raízes exibiram uma maior relação Na^+/K^+ quando comparada às folhas (Figura 15B). Em células vegetais, uma relação Na^+/K^+ igual a 1 é, geralmente, considerada como o valor máximo a partir da qual pode ocorrer inibição dos processos metabólicos (MAATHUIS & AMTMANN, 1999). Por exemplo, Aktas *et al.* (2006), estudando a variação genotípica para a tolerância à salinidade em plantas de pimenteira observaram que a relação Na^+/K^+ foi de 1,4 e de 0,5 para os genótipos mais sensível e mais tolerante, respectivamente. No presente trabalho, corroborando com os dados de Abreu (2004) e Alvarez Pizarro (2006), as relações Na^+/K^+ das folhas e das raízes das plântulas não-estressadas de ambas as condições ambientais ficaram próximas de 0,2. Entretanto, com exceção das folhas das plântulas de cajueiro da sala de germinação (Figura 15A), a aplicação do estresse salino elevou esta relação para valores maiores do que 1. Nas raízes, no tratamento a 200 mM de NaCl, as relações Na^+/K^+ ficaram próximas de 8 e de 5 nas plântulas da casa de vegetação e da sala de germinação, respectivamente (Figura 15B). Esses aumentos são de uma

ordem de magnitude muito superior aos observados anteriormente em plântulas de cajueiro anão-precoce submetidas à salinidade (ABREU, 2004; ALVAREZ PIZARRO, 2006) e podem indicar as causas para as maiores reduções do crescimento das raízes em relação às folhas.

4.6- Solutos orgânicos

4.6.1- Prolina

Em resposta à salinidade, as plântulas da casa de vegetação e da sala de germinação aumentaram o conteúdo de prolina nas folhas e nas raízes (Figura 16). Nas folhas, o acúmulo deste osmólito ocorreu progressivamente até o tratamento com NaCl a 100 mM, quando apresentou aumentos de 107 e 580% nas plântulas da sala de germinação e da casa de vegetação, respectivamente (Figura 16A). Já nos dois últimos tratamentos salinos (150 e 200 mM) os níveis de prolina tenderam a se estabilizar, atingindo na última dose de sal valores 189 e 742% maiores do que o controle, respectivamente, nas plântulas crescidas em sala de germinação e em casa de vegetação. Os teores de prolina nas raízes das plântulas da sala de germinação não foram alterados significativamente pelo tratamento com NaCl a 50 mM, enquanto que nas plântulas da casa de vegetação observou-se um aumento de 33,2% em relação ao controle (Figura 16B). Nas doses de 100, 150 e 200 mM de NaCl, os teores de prolina nas raízes das plântulas da sala de germinação aumentaram cerca de 28,3, 31,3 e 81,3%, respectivamente. Nestas mesmas doses de sal, os teores de prolina nas raízes das plântulas crescidas sob condições de casa de vegetação foram, em média, de 81,4% maior que aquele do controle. Em várias espécies vegetais, a prolina é o principal soluto orgânico que se acumula em resposta ao estresse salino, sendo muitas vezes relacionada com o grau de tolerância aos sais (ASHRAF & FOOLAD, 2007). Em adição ao seu papel na osmorregulação, tem sido sugerido que a prolina pode contribuir para proteger

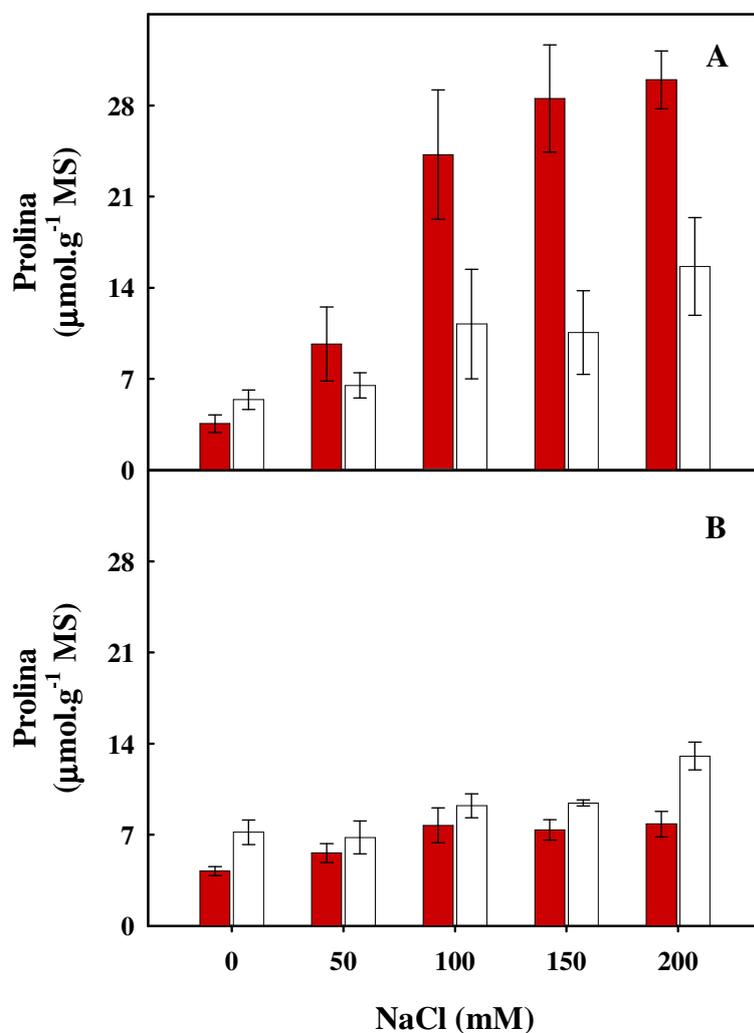


Figura 16. Teores de prolina nas folhas (A) e nas raízes (B) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

macromoléculas contra a desnaturação, além de atuar na remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por exemplo, na halófita *Plantago crassifolia*, um aumento de vinte vezes no conteúdo de prolina das folhas foi observado quando as plantas foram tratadas com 500 mM de NaCl, sendo este aumento relacionado com uma função protetora desse iminoácido (VICENTE *et al.*, 2004). Contudo, o acúmulo de prolina no processo de ajustamento osmótico e/ou de proteção, em plantas sob condições de estresse salino, é assunto ainda bastante questionado e alguns estudos o consideram como sendo meramente uma consequência do estresse (MOFTAH & MICHEL, 1987; LACERDA *et al.*, 2003). Em apoio a essa hipótese, neste trabalho, o estresse salino causou reduções mais severas na área foliar (Figura 4B) e nos teores de clorofila (Figuras 7 e 8) das plântulas cultivadas em casa de vegetação e foi justamente nas folhas dessas plântulas em que se observaram os maiores acúmulos de prolina com o estresse salino, quando comparadas com as da sala de germinação. Silveira *et al.* (2003), relacionaram o acúmulo de prolina, em folhas de plantas de cajueiro anão-precoce sob estresse com elevadas concentrações de sais, com a degradação de proteínas e com a redução do conteúdo de clorofila.

4.6.2- Carboidratos

Os teores de carboidratos nas folhas e nas raízes das plântulas não estressadas e cultivadas na casa de vegetação foram cerca de 21,9 e 23,3% maiores do que naquelas crescidas em sala de germinação, respectivamente (Figura 17). Em condições de estresse salino, os teores desse soluto nas folhas das plântulas cultivadas na casa de vegetação foram pouco alterados, sendo observado um aumento, em relação ao controle, de 16,4% apenas no tratamento com NaCl a 100 mM (Figura 17A). Por outro lado, nas plântulas da sala de germinação, a salinidade aumentou significativamente o conteúdo de carboidratos nas folhas em 24,6 e 40,8% nos tratamentos com NaCl a 150 e 200 mM, respectivamente. Nas raízes, os

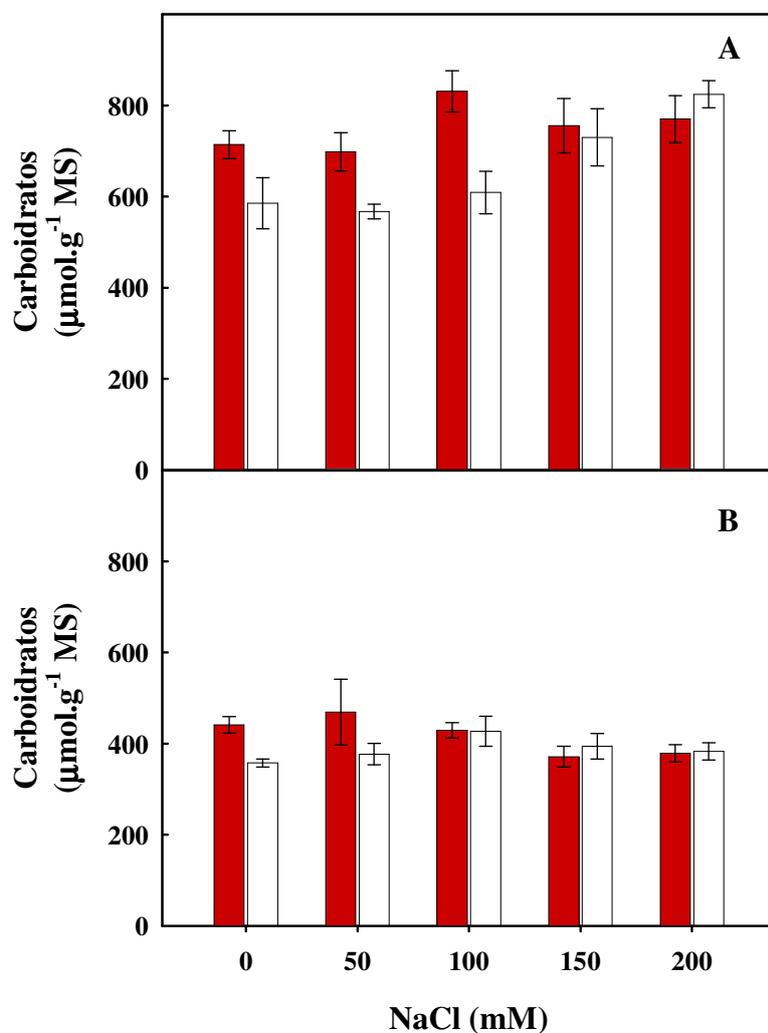


Figura 17. Teores de carboidratos solúveis nas folhas (A) e nas raízes (B) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

teores de carboidratos, tanto nas plântulas cultivadas em casa de vegetação como naquelas em sala de germinação, foram pouco alterados pela salinidade (Figura 17B). Em condições de casa de vegetação, os teores de carboidratos nas raízes não foram afetados até a dose de 100 mM de NaCl, sendo observado uma pequena redução apenas nos dois últimos tratamentos salinos (150 e 200 mM), em média, 14,9% em relação ao controle (Figura 17B). Já nas raízes das plântulas mantidas na sala de germinação, o estresse salino causou uma alteração significativa no teor de carboidratos apenas no tratamento com NaCl a 100 mM, com um aumento de 19,6% em relação às plântulas controle.

Vários autores relatam mudanças nos teores de carboidratos, em plantas submetidas à salinidade, que sugerem um papel desses solutos na adaptação das mesmas ao estresse salino (KEREPESI & GALIBA, 2000; GARG *et al.*, 2002). De acordo com Koyro *et al.* (2006), a habilidade da halófito *Plantago coronopus* (L.) para enfrentar a salinidade está relacionada com a manutenção de altos níveis de carboidratos solúveis, os quais serviriam tanto para o ajustamento osmótico como para a estabilização de estruturas celulares. É interessante destacar, que apesar dos decréscimos na fotossíntese líquida pela salinidade (Figura 5A), os teores de carboidratos, de modo geral, se mantiveram ou aumentaram com a salinidade, sendo reduzidos (em cerca de 15%) apenas nas raízes das plântulas da casa de vegetação estressadas com 150 e 200 mM de NaCl (Figura 17A). De acordo com Munns (2005), muitos solutos se acumulam em condições de estresses abióticos simplesmente porque o suprimento de assimilados pelas folhas excede sua demanda pelos tecidos em crescimento. Portanto, a manutenção dos níveis de carboidratos solúveis aqui observada, mesmo em altas concentrações de sais, pode ser resultado de uma redução na sua demanda pelos tecidos em crescimento.

4.6.3- N-aminossolúveis

Em condições controle, os conteúdos de N-aminossolúveis em folhas e raízes das plântulas da sala de germinação foram, respectivamente, 65,6 e 102% maiores do que naquelas cultivadas em casa de vegetação (Figura 18). Com a aplicação do estresse salino, a concentração de N-aminossolúveis nas folhas das plântulas da casa de vegetação aumentou significativamente, atingindo um valor máximo no tratamento de 150 mM de NaCl, sendo 163% maior que aquele do controle (Figura 18A). Da mesma forma, nas folhas das plântulas da sala de germinação ocorreram aumentos, com a salinidade, na concentração de N-aminossolúveis, sendo observado valores 68,3, 35,8 e 61,6% maiores do que o controle nos tratamentos a 100, 150 e 200 mM de NaCl, respectivamente. Os teores de N-aminossolúveis das raízes também foram afetados pelos sais, sendo as principais alterações observadas nas plântulas sob condições de casa de vegetação, as quais mostraram aumentos de 44,0, 91,1 e 66,1%, em relação ao controle, nos tratamentos de 100, 150 e 200 mM, respectivamente (Figura 18B). Já nas plântulas da sala de germinação, o conteúdo de N-aminossolúveis foi reduzido em 13,3% no tratamento de 50 mM, não sofreu modificações significativas nos tratamentos a 100 e 150 mM de NaCl e aumentou 26,9% nas plântulas estressadas com 200 mM desse sal, em relação ao controle. Em glicófitas expostas à salinidade, acredita-se que o aumento nos níveis de aminoácidos solúveis e o concomitante aumento do conteúdo de nitrogênio aminossolúvel podem contribuir para o controle do pH citosólico, bem como evitar a acumulação excessiva de NH_4^+ durante os períodos de estresse (GILBERT *et al.*, 1998). Os compostos contendo nitrogênio podem ainda ajudar na proteção de macromoléculas contra os efeitos tóxicos dos sais e na eliminação de ROS (MANSOUR, 2000).

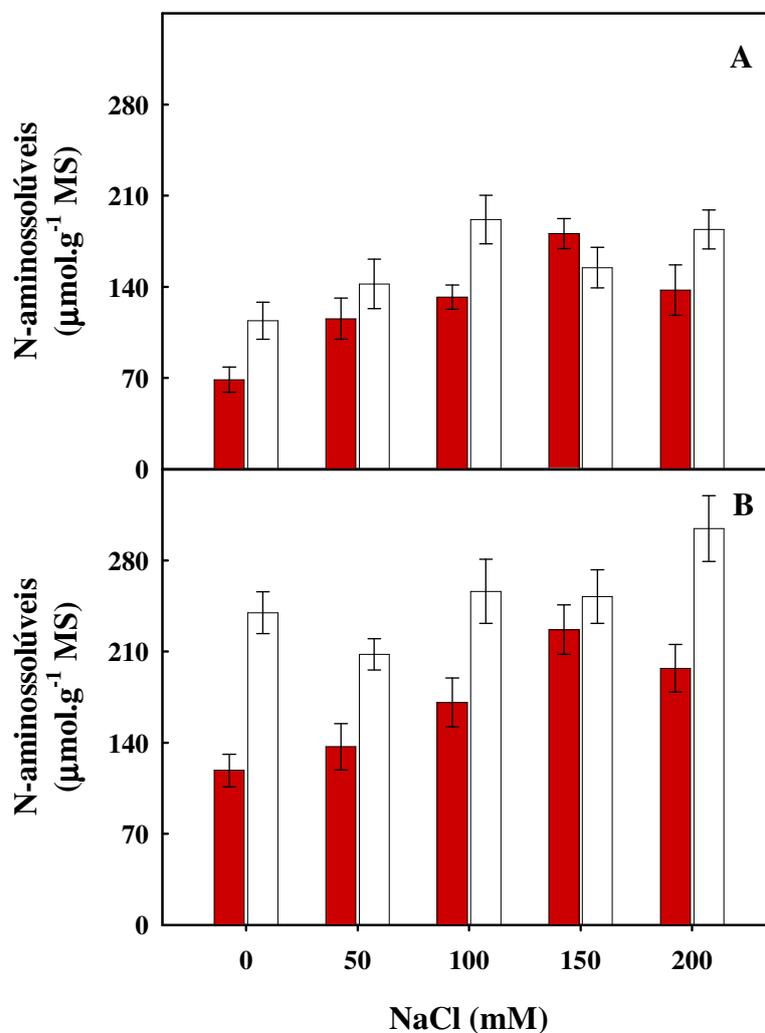


Figura 18. Teores de N-aminossolúveis nas folhas (A) e nas raízes (B) de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, submetidas a níveis crescentes de salinidade e cultivadas em condições de casa de vegetação (■) e de sala de germinação (□). As plântulas foram obtidas a partir da germinação de castanhas em cada uma das condições. As barras representam o desvio padrão.

4.7- Comparação dos padrões eletroforéticos bidimensionais

Análises preliminares, utilizando géis com gradiente de pH de 3,0 a 10,0, mostraram que a grande maioria das proteínas separadas por eletroforese bidimensional (2D) de folhas e de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce encontrava-se na faixa ácida. Por esta razão, a focalização isoeétrica foi realizada utilizando-se géis com pH na faixa de 4,0 a 7,0. Os resultados obtidos mostraram que o estresse salino alterou a expressão de diversas proteínas e de modos diferentes nas duas condições ambientais empregadas.

A comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas das folhas das plântulas crescidas em casa de vegetação revelou que 91 proteínas tiveram suas expressões alteradas pelo estresse salino (NaCl a 150 mM), ou seja, as variações nas intensidades dos spots, em relação ao controle, foram maiores do que duas vezes (Figura 19). Dessas 91 proteínas, 49 tiveram suas expressões aumentadas e 36 tiveram suas expressões reduzidas pela salinidade. Em adição, como pode ser observado na Figura 20, quatro proteínas desapareceram completamente não sendo, portanto, detectadas nos géis (Figuras 20K, 20L e 20O). Por outro lado, duas proteínas foram aparentemente sintetizadas *de novo* quando as plântulas foram submetidas à salinidade (Figura 20F). Nas folhas das plântulas cultivadas na sala de germinação, foram detectadas 54 proteínas com expressões modificadas pelo estresse salino, sendo que 21 delas aumentaram suas concentrações e 32 diminuíram em relação ao controle (Figura 21 e 22). Além disso, nenhuma proteína nova foi aparentemente sintetizada com a aplicação do estresse salino, sendo observado o desaparecimento de apenas uma proteína (Figura 22J).

É interessante destacar que as maiores mudanças quantitativas (indução ou repressão) e qualitativas (ausência ou presença) nas proteínas, pela salinidade, foram observadas nas folhas das plântulas cultivadas em casa de vegetação, as quais também apresentaram as maiores reduções no crescimento (Figura 4B) e os maiores teores de Na⁺ e Cl⁻ (Figuras 12A e

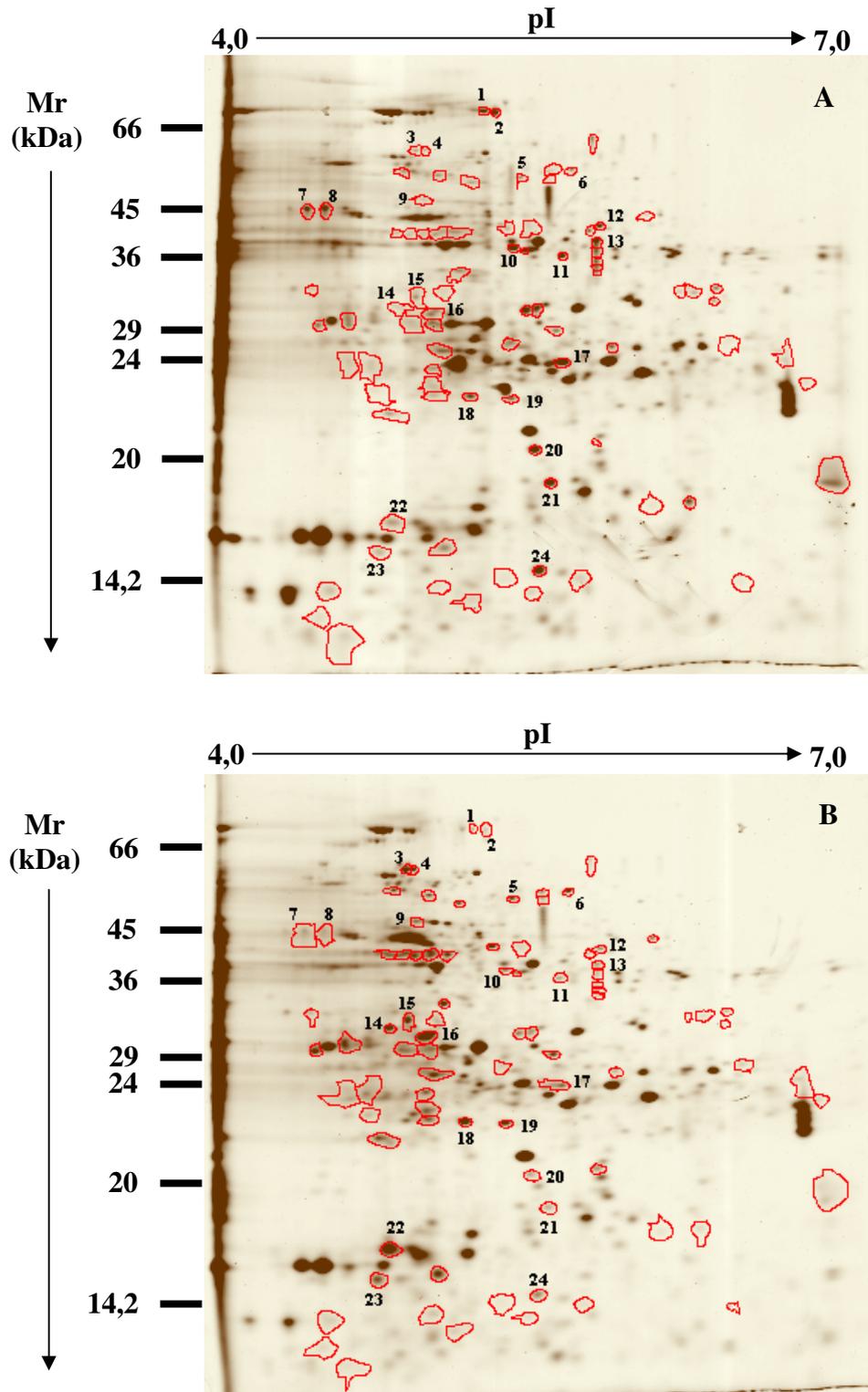


Figura 19. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de folhas de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em casa de vegetação, sob condições controle (A) e de estresse salino com NaCl a 150 mM (B). Em cada gel foram aplicados 50 μ g de proteínas. As manchas (*spots*) de proteínas induzidas ou reprimidas pelo estresse salino por um fator maior do que dois estão delimitadas por linhas em vermelho. Os *spots* numerados são mostrados em detalhe na Figura 20.

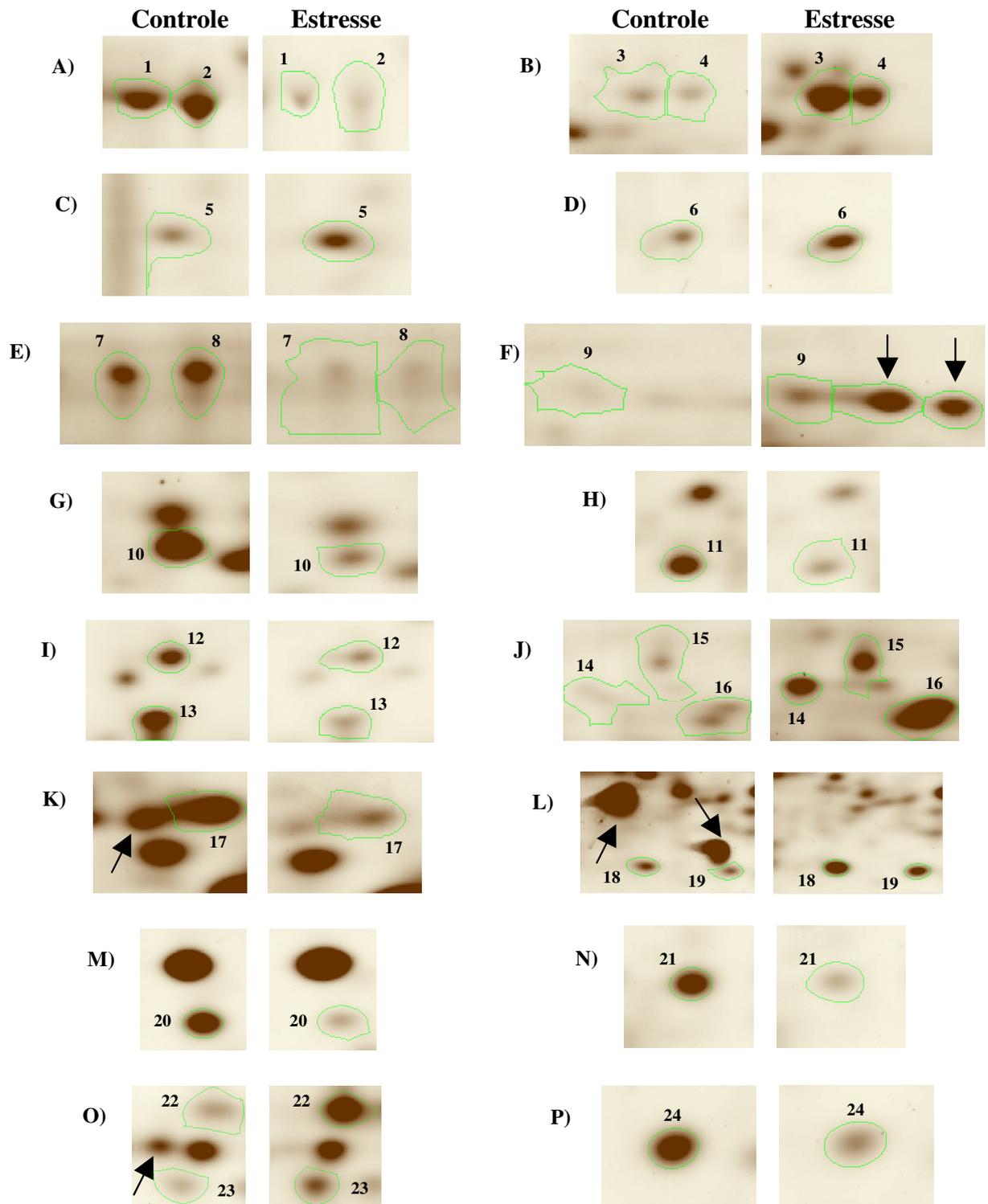


Figura 20. Principais alterações nos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de folhas de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em casa de vegetação, sob condições controle e de estresse salino com NaCl a 150 mM. Os *spots* numerados indicam as mesmas proteínas da Figura 19. As setas indicam proteínas que desapareceram completamente ou que foram aparentemente sintetizadas *de novo*.

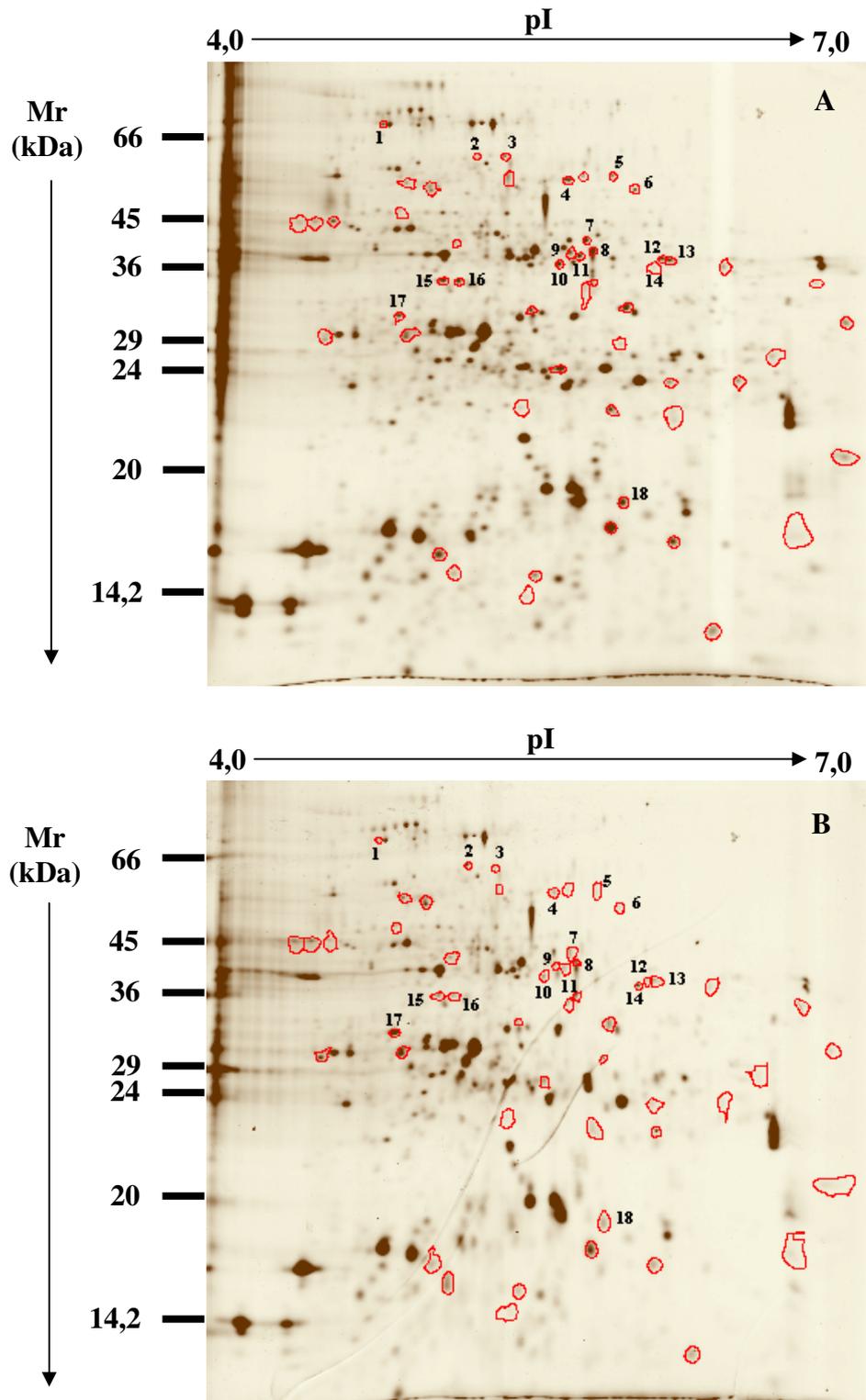


Figura 21. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de folhas de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em sala de germinação, sob condições controle (A) e de estresse salino com NaCl a 150 mM (B). Em cada gel foram aplicados 50 μ g de proteínas. As manchas (*spots*) de proteínas induzidas ou reprimidas pelo estresse salino por um fator maior do que dois estão delimitadas por linhas em vermelho. Os *spots* numerados são mostrados em detalhe na Figura 22.

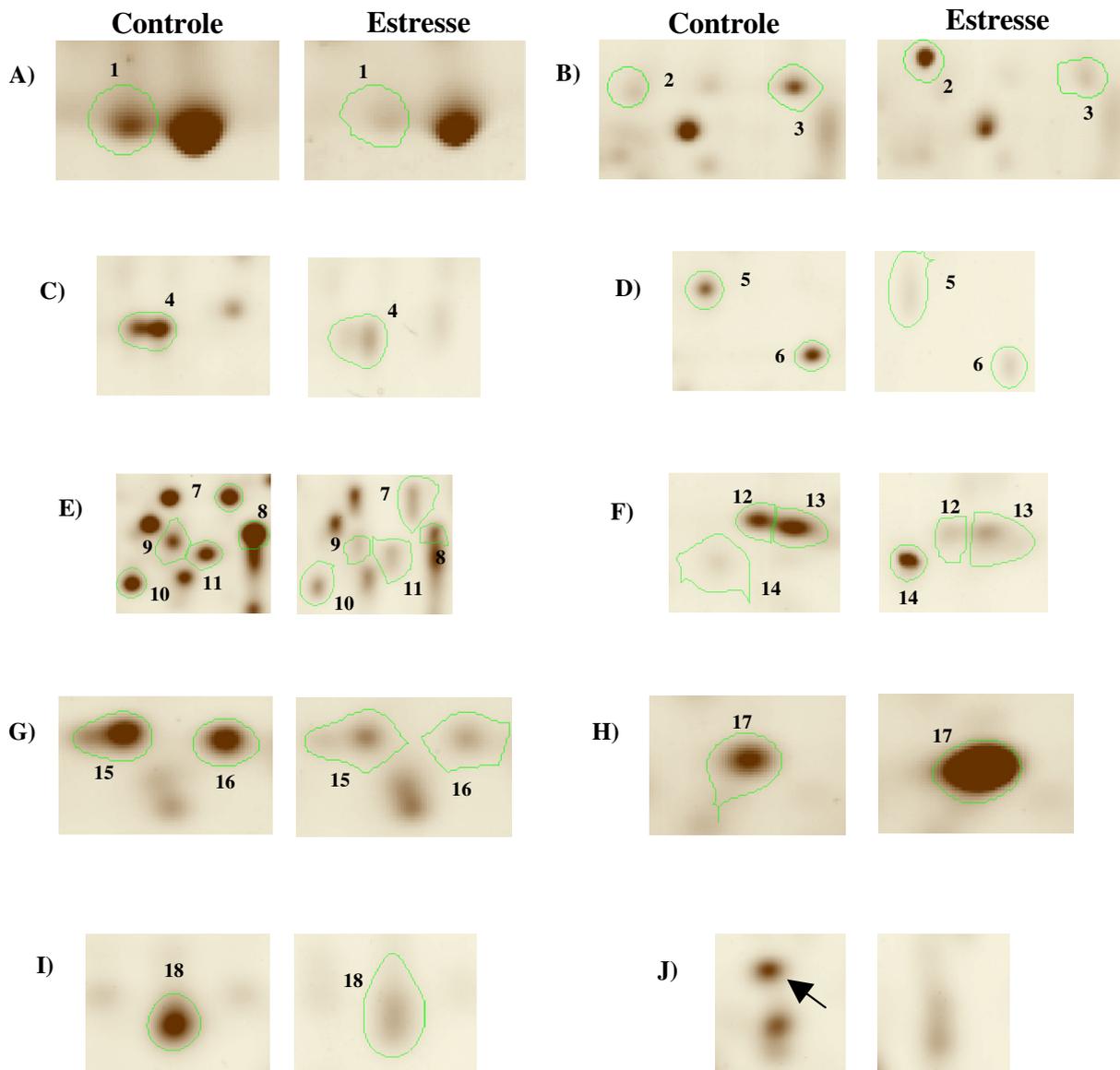


Figura 22. Principais alterações nos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de folhas de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em sala de germinação, sob condições controle e de estresse salino com NaCl a 150 mM. Os *spots* numerados indicam as mesmas proteínas da Figura 21. As setas indicam proteínas que desapareceram completamente ou que foram aparentemente sintetizadas *de novo*.

13A) em suas folhas. É possível, portanto, que algumas dessas modificações na expressão gênica possam representar respostas adaptativas ao estresse, enquanto outras sejam apenas conseqüências dos diversos danos secundários que o estresse salino provoca nas células.

Os padrões eletroforéticos 2D das proteínas expressas nas raízes das plântulas de cajueiro anão-precoce cultivadas em casa de vegetação, sob condições controle e de estresse salino, são mostrados na [Figura 23](#). Comparando-se esses padrões observa-se que a salinidade alterou a expressão de 42 proteínas, sendo que 12 mostraram aumentos nas suas expressões e 26 diminuíram suas expressões. Além disso, duas proteínas desapareceram completamente ([Figura 24D](#)) e duas foram aparentemente sintetizadas *de novo* ([Figuras 24I e 24J](#)). Nas plântulas cultivadas na sala de germinação, os números de proteínas do sistema radicular que tiveram suas expressões estimuladas ou reprimidas pela salinidade foram bastante semelhantes ao observado nas folhas. A análise mostrou que 54 proteínas tiveram suas expressões diferencialmente reguladas pelo estresse salino, sendo que 22 foram induzidas e 30 tiveram suas expressões reduzidas em relação ao controle ([Figura 25](#)). Além disso, duas proteínas foram aparentemente sintetizadas *de novo* quando as plântulas foram submetidas à salinidade ([Figura 26J](#)). Portanto, ao contrário do que ocorreu nas folhas, as maiores mudanças nas proteínas das raízes ocorreram nas plântulas cultivadas sob condições de sala de germinação, o que pode ser devido ao maior número de proteínas detectadas nas raízes dessas plântulas (342 proteínas) em relação àquelas da casa de vegetação (206 proteínas).

Vários estudos relatam alterações nos padrões de expressão das proteínas em plantas sob condições de estresse osmótico ([RICCARDI et al., 1998](#); [KAV et al., 2004](#); [PARIDA et al., 2005](#); [ZANG & KOMATSU, 2007](#); [JAIN et al., 2006](#)). Em cultivares de gergelim (*Sesamum indicum*), por exemplo, [Gehlot et al. \(2005\)](#) observaram alterações no padrão de expressão das proteínas de sementes tratadas com diferentes concentrações de sal. Em *Eucalyptus microtheca*, a comparação dos padrões protéicos de raízes de dois clones desta

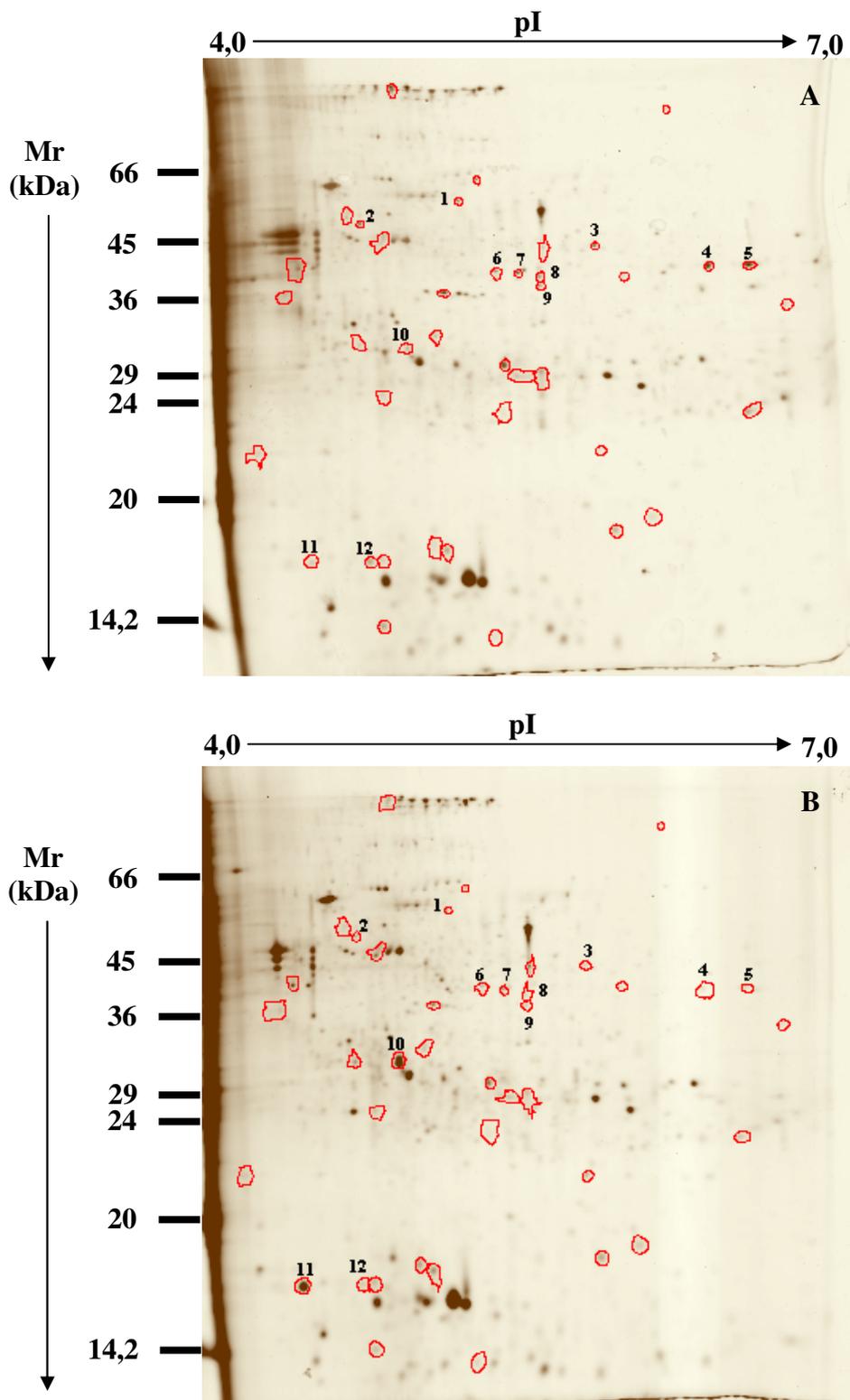


Figura 23. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em casa de vegetação, sob condições controle (A) e de estresse salino com NaCl a 150 mM (B). Em cada gel foram aplicados 50 μ g de proteínas. As manchas (*spots*) de proteínas induzidas ou reprimidas pelo estresse salino por um fator maior do que dois estão delimitadas por linhas em vermelho. Os *spots* numerados são mostrados em detalhe na Figura 24.

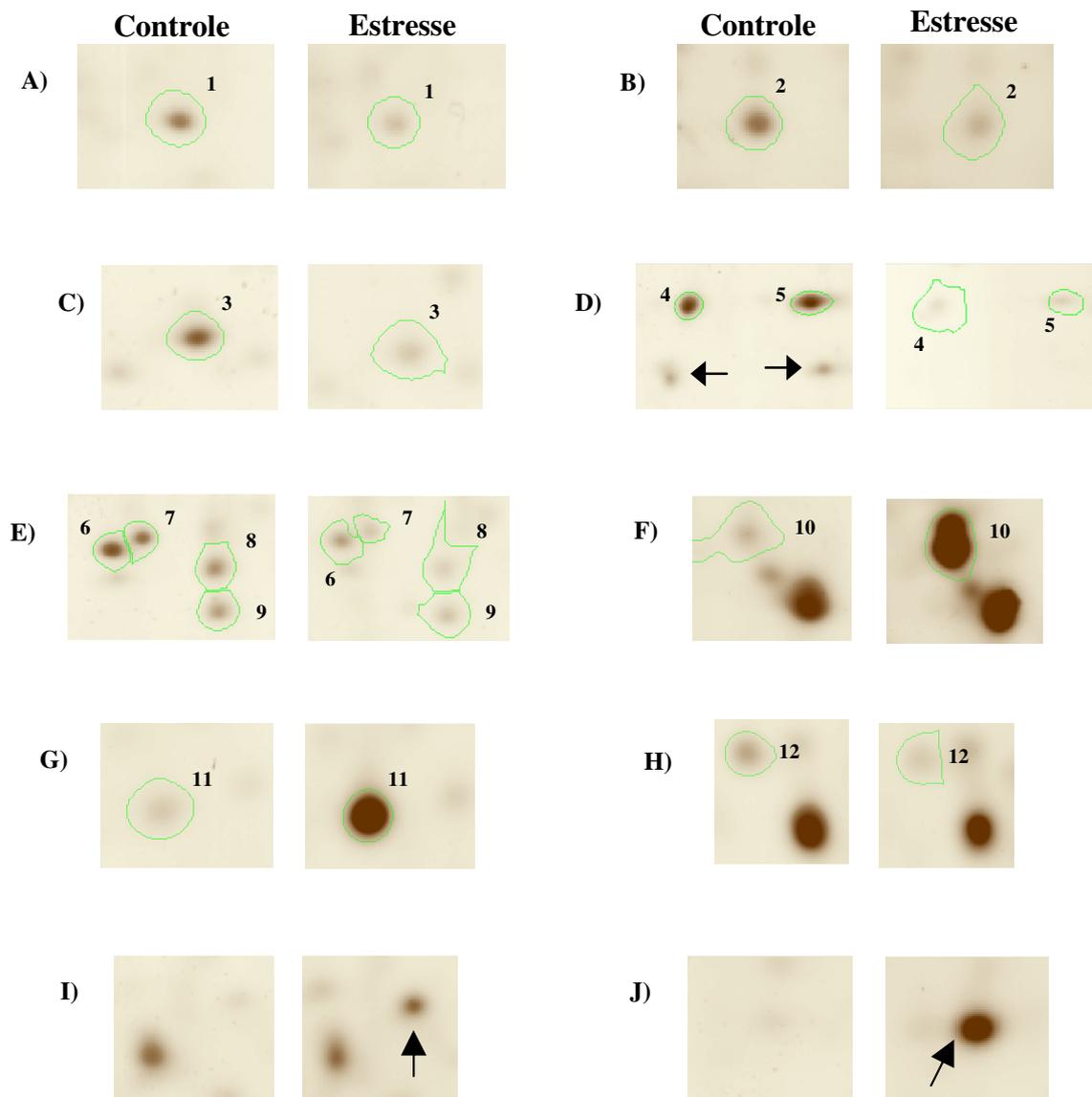


Figura 24. Principais alterações nos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em casa de vegetação, sob condições controle e de estresse salino com NaCl a 150 mM. Os *spots* numerados indicam as mesmas proteínas da Figura 23. As setas indicam proteínas que desapareceram completamente ou que foram aparentemente sintetizadas *de novo*.

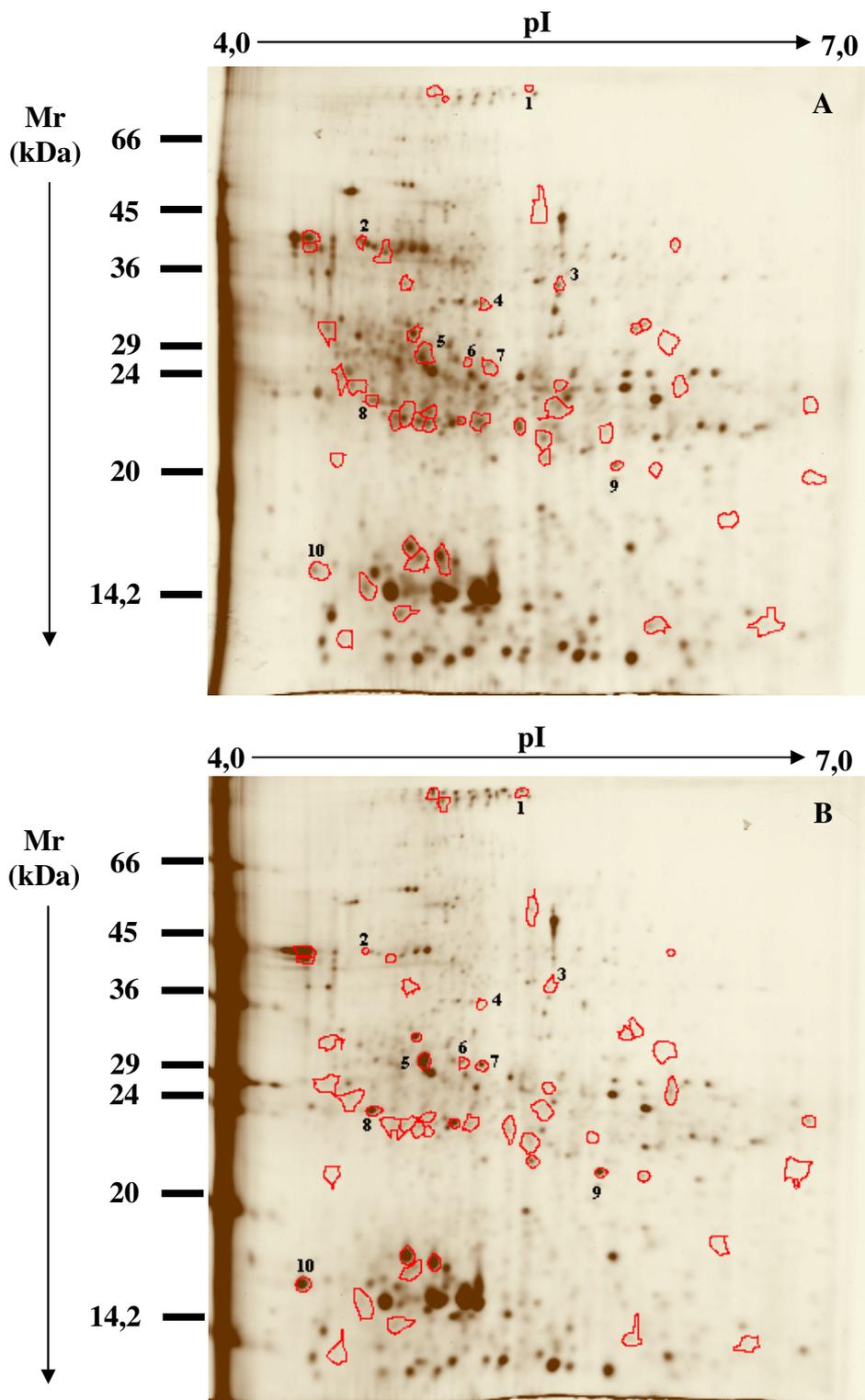


Figura 25. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em sala de germinação, sob condições controle (A) e de estresse salino com NaCl a 150 mM (B). Em cada gel foram aplicados 50 μ g de proteínas. As manchas (*spots*) de proteínas induzidas ou reprimidas pelo estresse salino por um fator maior do que dois estão delimitadas por linhas em vermelho. Os *spots* numerados são mostrados em detalhe na Figura 26.

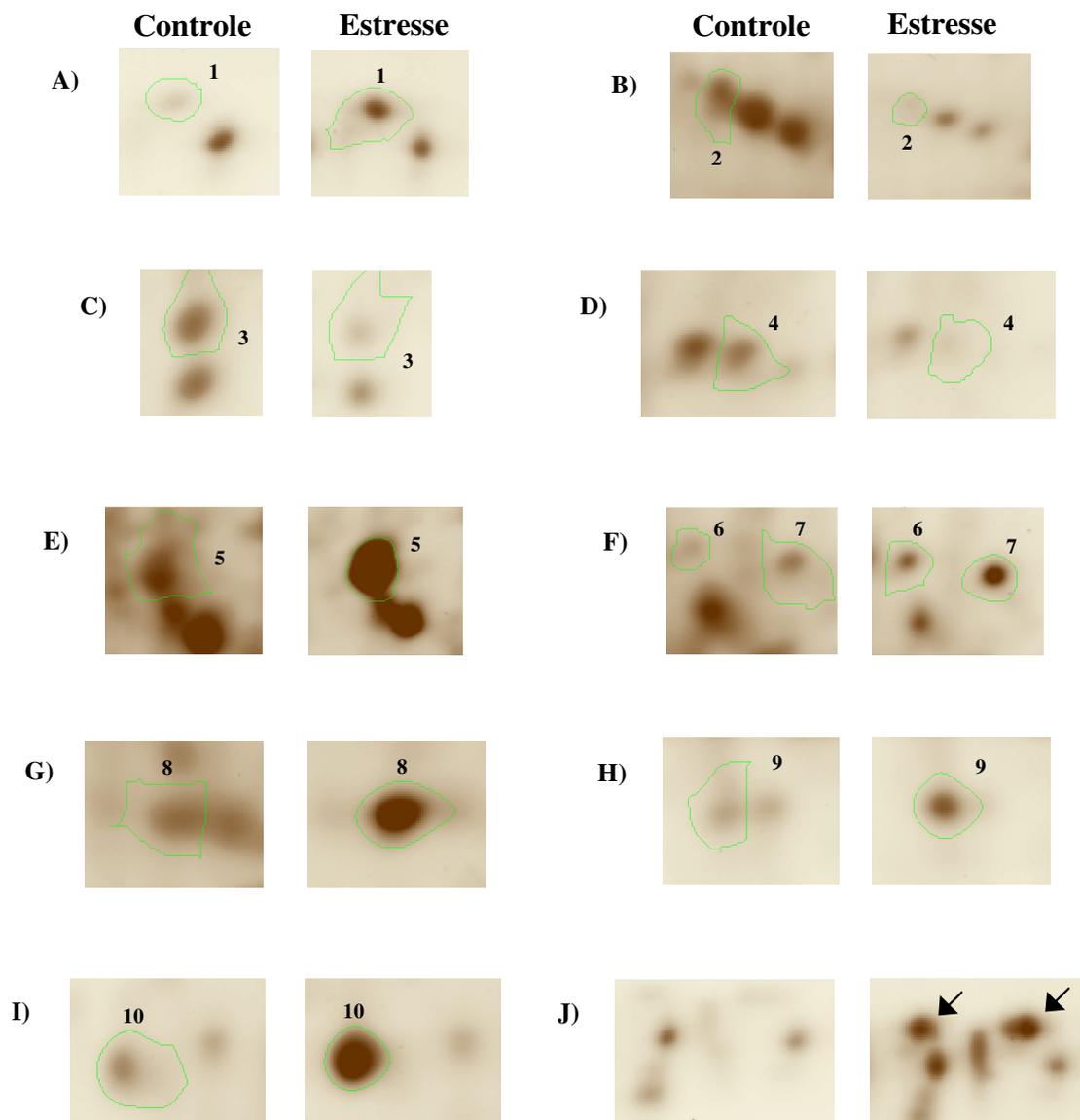


Figura 26. Principais alterações nos padrões eletroforéticos 2D das proteínas de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce, clone CCP 06, cultivadas em sala de germinação, sob condições controle e de estresse salino com NaCl a 150 mM. Os *spots* numerados indicam as mesmas proteínas da Figura 25. As setas indicam proteínas que desapareceram completamente ou que foram aparentemente sintetizadas *de novo*.

espécie submetidos ao estresse salino (NaCl a 200 mM), revelou a indução de uma proteína de 18 kDa em ambos os clones (MORABITO *et al.*, 1996). Zörb *et al.* (2004) verificaram alterações no padrão de expressão das proteínas de plantas de milho submetidas a baixas e altas concentrações de NaCl (25 e 100 mM). Dentre as proteínas com expressões alteradas pela salinidade, foram identificadas enzimas envolvidas na modificação de proteínas por fosforilação (p.ex. quinase da adenosina), no metabolismo do carbono (p.ex. desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato e β -glucosidase) e do nitrogênio (p.ex. sintase da metionina).

Considerando-se a natureza multigênica das respostas das plantas ao estresse salino (VINOCUR & ALTMAN, 2005), pode-se especular que, as modificações aqui observadas na expressão gênica das plântulas de cajueiro submetidas à salinidade, possam ter provocado alterações nas concentrações de proteínas envolvidas em várias vias metabólicas, resultando em respostas não-específicas. Além do mais, embora não tenha sido feita uma análise comparativa detalhada dos géis nas duas condições de cultivo empregadas, estas, provavelmente, também tiveram influência sobre a regulação da expressão das proteínas nos diferentes órgãos estudados. Uma simples análise dos padrões eletroforéticos 2D, nas duas condições ambientais, mostra que a salinidade alterou diferentemente a expressão gênica, tanto com relação ao número como ao tipo de proteína modificada. Por exemplo, nas folhas das plântulas da casa de vegetação, as proteínas 22 e 23 (Figura 200) aumentaram suas concentrações com a salinidade, enquanto que nas plântulas da sala de germinação elas não mostraram alterações em suas expressões. Tais resultados adicionam um nível de complexidade ainda maior para o entendimento dos mecanismos envolvidos na aclimação das plântulas de cajueiro à ambientes salinos. Portanto, tornam-se indispensáveis o sequenciamento e a identificação das proteínas com níveis de expressão alterados, para que se possa inferir sobre seus possíveis papéis na aclimação das plântulas de cajueiro às condições de salinidade.

5- CONCLUSÕES

- As condições ambientais da sala de germinação foram menos favoráveis ao crescimento e desenvolvimento das plântulas de cajueiro anão-precoce do que aquelas da casa de vegetação;
- Os efeitos da salinidade no crescimento e desenvolvimento das plântulas foram mais acentuados naquelas cultivadas em casa de vegetação;
- Nas duas condições de cultivo, os efeitos inibitórios do NaCl no crescimento das plântulas foram mais acentuados nas raízes do que na parte aérea;
- As plântulas cultivadas em casa de vegetação sofreram maiores reduções nas trocas gasosas e no potencial osmótico devido à salinidade;
- A redução na fotossíntese líquida induzida pela salinidade nas plântulas de cajueiro deveu-se, em parte, a fatores não relacionados aos estômatos;
- Os maiores teores de clorofila observados nas plântulas cultivadas em sala de germinação representam um possível mecanismo de aclimatação para maximizar a absorção de luz em condições de baixa intensidade luminosa;
- O medidor portátil de clorofila, SPAD-502, pode substituir, com boa precisão, as determinações tradicionais dos teores de clorofila nas folhas de cajueiro, pelo menos, em experimentos em que os valores absolutos não são necessários;
- As plântulas da casa de vegetação, em relação às da sala de germinação, apresentaram os maiores acúmulos de Na^+ e Cl^- nas folhas;
- As plântulas de cajueiro, em ambas as condições de cultivo, limitaram o transporte de Na^+ e Cl^- para a parte aérea em concentrações de NaCl no meio de cultivo acima de 100 mM, acumulando-os, pelo menos em parte, nas raízes;
- Dos solutos orgânicos estudados, a prolina foi a que apresentou maiores aumentos em seus teores com a salinidade, em ambas as condições de cultivo;
- A expressão gênica nas folhas e raízes das plântulas de cajueiro anão-precoce foi alterada tanto pelo estresse salino quanto pelas condições de cultivo empregadas, não sendo possível se estabelecer uma correlação entre o nível de expressão das proteínas e as modificações fisiológicas e bioquímicas ocorridas durante o período de estresse.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, T.; GUENZI, A. C.; MARTIN, B.; CUSHMAN, J. C. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. **Plant Physiology**, v. 131, p. 1748-1755, 2003.

ABREU, C. E. B. **Crescimento, osmorregulação e mobilização de reservas em plântulas de cajueiro anão-precoce submetidas à salinidade**. Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará, 2004. Originalmente apresentada como monografia de graduação.

AKTAS, H.; ABAK, K.; CAKMAK, I. Genotypic variation in the response of pepper to salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 260-266, 2006.

ALI, G.; SRIVASTAVA, P. S.; IQBAL, M. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in *Bacopa monniera* regenerants grown under NaCl stress. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 89-95, 1999.

ALI, G. M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 396-403, 2006.

ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 224-233, 1997.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ALVAREZ PIZARRO, J. C. **Caracteres fisiológicos e bioquímicos da tolerância à salinidade em clones de cajueiro anão-precoce**. Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará, 2006. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado.

AMOR, N. B.; HAMED, K. B.; DEBEZ, A.; GRIGNON, C.; ABDELLY, C. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. **Plant Science**, v. 168, p. 889-899, 2005.

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

ANGELOCCI, L. R. **Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico**. Piracicaba: Divisão de Biblioteca e Documentação - ESALQ/USP, 2002.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

APSE, M. P.; AHARON, G. S.; SNEDDEN, W. A.; BLUMWALD, E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. **Science**, v. 285, p. 1256-1258, 1999.

APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 146-150, 2002.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of Glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.

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

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. **Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches**. New York: The Haworth Press, 2005.

AZEVEDO-NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C. E. B.; GOMES-FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 87-94, 2006.

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; LACERDA, C. F.; SILVA, J. V.; COSTA, P. H. A.; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 31-38, 2004.

BACKHAUSEN, J. E.; KLEIN, M.; KLOCKE, M.; JUNG, S.; SCHEIBE, R. Salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée) plants depends on light intensity and air humidity. **Plant Science**, v. 169, p. 229-237, 2005.

BAÑULS, J.; PRIMO-MILLO, E. Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of *Citrus* plants. **Physiologia Plantarum**, v. 86, p. 115-123, 1992.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

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

BÉRCZI, A.; MØLLER, I. M. Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 1287-1302, 2000.

BETHKE, P. C.; DREW, M. C. Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annuum* during progressive exposure to NaCl salinity. **Plant Physiology**, v. 99, p. 219-226, 1992.

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

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.

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.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 431-434, 2000.

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

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1099-1111, 1995.

BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 237-260, 1999.

BOUCHEZ, D.; HÖFTE, H. Functional genomics in plants. **Plant Physiology**, v. 118, p. 725-732, 1998.

BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, v. 218, p. 443-448, 1982.

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. 72, p. 246-254, 1976.

BRAG, H. The influence of potassium on the transpiration rate and stomatal opening in *Triticum aestivum* and *Pisum sativum*. **Physiologia Plantarum**, v. 26, p. 250-257, 1972.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK. Responses to abiotic stress. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Mariland: American Society of Plant Physiologist, 2000, p. 1158-1203.

BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Plants use calcium to resolve salt stress. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 411-412, 1998.

CÁMARA-ZAPATA, J. M.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F.; MARTINEZ, V.; NIEVES, M.; CERDÁ, A. Effects of NaCl on citrus cultivars. **Agronomie**, v. 24, p. 155-160, 2004.

CARCELLER, M.; PRYSTUPA, P.; LEMCOFF, J. H. Remobilization of proline and other nitrogen compounds from senescing leaves of maize under water stress. **Journal Agronomy & Crop Science**, v. 183, p. 61-66, 1999.

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

CAVALCANTI JUNIOR, A. T. **Morfo-fisiologia da germinação e estabelecimento da plântula do cajueiro-anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.)**. Lavras, MG: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1994. Originalmente apresentada como tese de doutorado.

CAVALCANTI JUNIOR, A. T.; CHAVES, J. C. M. **Produção de mudas de cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001, documentos nº 42.

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.

CHARTZOULAKIS, K. S.; LOUPASSAKI, M.; BERTAKY, M.; ANDROULAKIS, I. Effects of NaCl on growth, ion content and CO₂ assimilation rate of six olive cultivars. **Scientia Horticulture**, v. 96, p. 235-247, 2002.

CHAVAN, P. D.; KARADGE, B. A. Growth, mineral nutrition, organic constituents and rate of photosynthesis in *Sesbania grandiflora* grown under saline conditions. **Plant Soil**, v. 93, p. 395-404, 1986.

CHAVES-FILHO, J. T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 199-204, 2001.

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

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.

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

COSTA, P. H.; SILVA, J. V.; BEZERRA, M. A.; ENÉAS-FILHO, J.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Crescimento em níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 289-297, 2003.

CRAMER, G. R.; LÄUCHLI, A.; POLITO, V. S. Displacement of Ca^{+2} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? **Plant Physiology**, v. 79, p. 207-211, 1985.

CULLIS, C. A. **Plant genomics and proteomics**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.

DAVIES, W. J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 55-76, 1991.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

DEMIRAL, T.; TÜRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 247-257, 2005.

DOWNTON, W. J. S. Photosynthesis in salt-stressed grapevines. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 4, p. 183-192, 1977.

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

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 106, p. 119-133, 2005.

EKER, S.; CÖMERTPAY, G.; KONUSKAN, O.; ÜLGER, A. C.; ÖZTÜRK, L.; ÇAKMAK, I. Effect of salinity stress on dry matter production and ion accumulation in hybrid maize varieties. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 30, p. 365-373, 2006.

FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush>.

FELLE, H. H. The H⁺/Cl⁻ symporter in root hair cells of *Sinapis alba*. **Plant Physiology**, v. 106, p. 1131-1136, 1994.

FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 307-319, 2004.

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.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364, 2003.

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

GARCÍA-SÁNCHEZ, F.; SYVERTSEN, J. P.; MARTÍNEZ, V.; MELGAR, J. C. Salinity tolerance of 'Valencia' orange trees on rootstocks with contrasting salt tolerance is not improved by moderate shade. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3697-3706, 2006.

GARG, A. K.; KIM, J. -K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance to different abiotic stresses. **PNAS**, v. 99, p. 15898-15903, 2002.

GARG, N; SINGLA, R. Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 137-146, 2004.

GAXIOLA, R.; LI, J.; UNDURRAGA, S., DANG, L. M.; ALLEN, G. J.; ALPER, S.; FINK, G. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. **PNAS**, v. 98, p. 11444-11449, 2001.

GEHLOT, H. S.; PUROHIT, A.; SHEKHAWAT, N. S. Metabolic changes and protein patterns associated with adaptation to salinity in *Sesamum indicum* cultivars. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 31-39, 2005.

GHEYI, H. R. Problema de salinidade na agricultura irrigada. In: Oliveira, T. S.; Assis Júnior, R. N.; Romero, R. E.; Silva, J. R. C. (Eds.). **Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido**. Fortaleza, CE: DCS/UFC, 2000, p. 329-346.

GHOULAM, C.; FOURSY, A.; FARES, K. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 39-50, 2002.

GILBERT, G. A.; GADUSH, M. V.; WILSON, C.; MADORE, M. A. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 107-114, 1998.

GRATTAN S. R.; GRIEVE, 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. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.

GYGI, S. P.; RIST, B.; AEBERSOLD, R. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 396-401, 2000.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

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.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 413-434, 1999.

HOLMBERG, N.; BÜLOW, L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 61-66, 1998.

HURKMAN, W. J. Effects of salt stress on plant gene expression: a review. **Plant and Soil**, v. 146, p. 145-151, 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

JAIN, S.; SRIVASTAVA, S.; SARIN, N. B.; KAV, N. N. V. Proteomics reveals elevated levels of PR 10 proteins in saline-tolerant peanut (*Arachis hypogaea*) calli. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 253-259, 2006.

JENNINGS, D. H. Halophytes, succulence and sodium in plants - a unified theory. **New Phytologist**, v. 67, p. 899-911, 1968.

KANG, H. -M.; SALTVEIT, M. E. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 548-556, 2001.

KAO, W. -Y, TSAI, T. -T.; TSAI, H. -C.; SHIH, C. -N. Response of three *Glycine* species to salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 120-125, 2006.

KAV, N. N. V; SRIVASTAVA, S.; GOONEWARDENE, L.; BLADE, S. F. Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. **Annals Applied Biology**, v. 145, p. 217-230, 2004.

KAVI KISHOR, P. B.; HONG, Z.; MIAO, G.-H.; HU, C.-A. A.; VERMA, D. P. S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387-1394, 1995.

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. **The Plant Cell**, v. 13, p. 889-905, 2001.

KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, v. 40, p. 482-487, 2000.

KHAN, M. A.; UNGAR, I. A.; SHOWALTER, A. M. The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. **Journal of Arid Environments**, v. 45, p. 73-84, 2000.

KOYRO, H. -W. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 136-146, 2006.

KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology**, Monograph No.1, p. 1-29, 1997.

KUMAR, S. G.; REDDY, A. M.; SUDHAKAR, C. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. **Plant Science**, v. 165, p. 1245-1251, 2003.

LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M. A.; RUIZ, H. A. Osmotic adjustment in roots and leaves of two sorghum genotypes under NaCl stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 113-118, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

LONGSTRETH, D. J.; NOBEL, P. S. Salinity effects on leaf anatomy. **Plant Physiology**, v. 63, p. 700-703, 1979.

LORENZEN, I.; ABERLE, T.; PLIETH, C. Salt stress-induced chloride flux: a study using transgenic *Arabidopsis* expressing a fluorescent anion probe. **The Plant Journal**, v. 38, p. 539-544, 2004.

LORETO, F.; CENTRITTO, M.; CHARTZOULAKIS, K. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 595-601, 2003.

MAATHUIS, F. J. M. The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1137-1147, 2006.

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

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

MANN, M.; JENSEN, O. N. Proteomic analysis of pos-translational modifications. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 255-261, 2003.

MANN, M.; PANDEY, A. Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, p. 54-61, 2001.

MANSOUR, M. M. F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 491-500, 2000.

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

MANSOUR, M. M. F.; SALAMA, K. H. A.; AL-MUTAWA, M. M. Transport proteins and salt tolerance in plants. **Plant Science**, v. 164, p. 891-900, 2003.

MÄSER, P.; GIERTH, M.; SCHROEDER, J. I. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. **Plant and Soil**, v. 247, p. 43-54, 2002.

MATTIONI, C.; LACERENZA, N. G.; TROCCOLI, A.; De LEONARDIS, A. M.; Di FONZO, N. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 787-792, 1997.

McKERSIE, B. D.; LESHEM, Y. Y. **Stress and stress coping and cultivated plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishes, 1^a ed., 1994.

MICHELET, B.; BOUTRY, M. The plasma membrane H⁺-ATase, a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1-6, 1995.

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

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 15-19, 2006.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 490-498, 2004.

MITTOVA, V.; TAL, M.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerance wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 393-400, 2002.

MO, W.; KARGER, B. L. Analytical aspects of mass spectrometry and proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 666-675, 2002.

MOFTAH, A. E.; MICHEL, B. E. The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. **Plant Physiology**, v. 83, p. 238-240, 1987.

MORABITO, D.; JOLIVET, Y.; PRAT, D.; DIZENGREMEL, P. Differences in the physiological responses of two clones of *Eucalyptus microtheca* selected for their salt tolerance. **Plant Science**, v. 114, p. 129-139, 1996.

M'RAH, S.; OUERGHI, Z.; BERTHOMIEU, C.; HAVAUX, M.; JUNGAS, C.; HAJJI, M.; GRIGNON, C.; LACHAÂL, M. Effects of NaCl on the growth, ion accumulation and photosynthetic parameters of *Thellungiella halophila*. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1022-1031, 2006.

MUHLING, K. H.; LAUCHLI, A. Effects of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 137-146, 2002.

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

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

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

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

NAVARRO, A.; BAÑÓN, S.; OLMOS, E.; SÁNCHEZ-BLANCO, M. J. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. **Plant Science**, v. 172, p. 473-480, 2007.

NEUMANN, P. Salinity resistance and plant growth revisited. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p. 1193-1198, 1997.

NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G.; MARTINS, F. A. D.; PÁDUA, T. R. P.; PINHO, P. J. Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, nitrogênio, enxofre, ferro e manganês do algodoeiro herbáceo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 517-521, 2005.

NEVES, L. L. M.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R.; MARTINEZ, C. A.; SALOMÃO, L. C. C. Crescimento, trocas gasosas e potencial osmótico da bananeira-‘prata’, submetida a diferentes doses de sódio e cálcio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 524-529, 2002.

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

NIU, X.; NARASIMHAN, M. L.; SALZMAN, R. A.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. **Plant Physiology**, v. 103, p. 713-718, 1993.

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.

NOMANI, H.; BOYER, J. S. Direct demonstration of a growth-induced water potential gradient. **Plant Physiology**, v. 102, p. 13-19, 1993.

OLIVEIRA, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. In: **Simpósio “Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura Irrigada”**. UFPB, Campina Grande, PB, Brasil, 1997, p. 3-35.

OWENS, S. Salt of the earth. **EMBO Reports**, v. 21, p. 877-879, 2001.

PARDO, J. M.; QUINTERO, F. J. Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. 2002. Disponível em: <http://genomebiology.com/2002/3/6/reviews/1017.1>.

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

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. **Photosynthetica**, v. 41, p. 191-200, 2003.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees**, v. 18, p. 167-174, 2004.

PARIDA, A. K.; MITTRA, B.; DAS, A. B.; DAS, T. K.; MOHANTY, P. High salinity reduces the content of a highly abundant 23-kDa protein of the mangrove *Bruguiera parviflora*. **Planta**, v. 221, p. 135-140, 2005.

PATAKAS, A.; NIKOLAOU, N.; ZIOZIOU, E.; RADOGLU, K.; NOITSAKIS, B. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Science**, v. 163, p. 361-367, 2002.

PETOLINO, J. F.; LEONE, I. A. Saline aerosol: some effects on the physiology of *Phaseolus vulgaris* (Cultivar Toporop). **Phytopathology**, v. 70, p. 225-232, 1980.

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

RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, p. 307-316, 1997.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 141-151, 2002.

RAMPITSCH, C.; SRINIVASAN, M. The application of proteomics to plant biology: a review. **Canadian Journal of Botany**, v. 84, p. 883-892, 2006.

RAWAT, J. S.; BANERJEE, S. P. The influence of salinity on growth, biomass production and photosynthesis of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and *Dalbergia sissoo* Roxb. Seedlings. **Plant and Soil**, v. 205, p. 163-169, 1998.

REA, P. A.; SANDERS, D. Tonoplast energization: 2 H⁺ pumps, one membrane. **Physiologia Plantarum**, v. 71, p. 131-141, 1987.

REINHARDT, D. H.; ROST, T. L. Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedlings in cotton seedlings roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 35, p. 563-574, 1995.

RENGASAMY, P. World salinization with emphasis on Australia. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1017-1023, 2006.

RENSINK, W. A.; BUELL, C. R. Microarray expression profiling resources for plant genomics. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 603-609, 2005.

RENSINK, W. A.; IOBST, S.; HART, A.; STEGALKINA, S.; LIU, J.; BUELL, C. R. Gene expression profiling of potato responses to cold, heat, and salt stress. **Functional and Integrative Genomics**, v. 5, p. 201-207, 2005.

RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; de VIENNE, D.; ZIVY, M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1253-1263, 1998.

RICHARDS, L. A. **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. US Salinity Laboratory Staff. US Dept. Agric. Handbook n° 60. USA. 160p., 1954.

ROBINSON, M. F.; VÉRY, A. -A.; SANDERS, D.; MANSFIELD, T. A. How can stomata contribute to salt tolerance? **Annals of Botany**, v. 80, p. 387-393, 1997.

RODRÍGUEZ, H. G.; ROBERTS, J. K. M.; JORDAN, W. R.; DREW, M. C. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedling during salt stress. **Plant Physiology**, v. 113, p. 881-893, 1997.

RODRÍGUEZ, P.; TORRECILLAS, A.; MORALES, M. A.; ORTUÑO, M. F.; SÁNCHEZ-BLANCO, M. J. Effects of NaCl salinity and water stress on growth and leaf water relations of *Asteriscus maritimus* plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 113-123, 2005.

ROMERO-ARANDA, R.; SORIA, T.; CUARTERO, J. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, v. 160, p. 265-272, 2001.

RUIZ, J. M. Engineering salt tolerance in crop plants. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 451, 2001.

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

SAKAMOTO, A.; MURATA, N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 81-88, 2000.

SALEKDEH, G. H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L. J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. **Field Crops Research**, v. 76, p. 199-219, 2002.

SALIM, M. Effects of salinity and relative humidity on growth and ionic relations of plants. **New Phytologist**, v. 113, p. 13-20, 1989.

SAWAHEL, W. A.; HASSAN, A. H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. **Biothecnology Letters**, v. 24, p. 721-725, 2002.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 31, p. 279-292, 2002.

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

SERRANO, L.; PUGNAIRE, F. I.; DOMINGO, F.; PARDOS, J. A. Absorption of radiation, photosynthesis, and biomass production in plants. In: Pessaraki, M. (ed.). **Handbook of plant and crop physiology**. Arizona: Marcel Dekker, Inc., 1995, p. 243-256.

SHI, H.; ISHITANI, M.; KIM, C.; ZHU, J. -K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/K⁺ antiporter. **PNAS**, v. 97, 2000.

SIEDOW, J. N.; DAY, D. A. Respiration and photorespiration. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Mariland: American Society of Plant Physiologist, 2000, p. 676-728.

SILVEIRA, J. A. G.; VIÉGAS, R. A.; ROCHA, I. M. A.; MOREIRA, A. C. O. M.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 115-123, 2003.

SINGH, N. K.; HANDA, A. K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. **Plant Physiology**, v. 79, p. 126-137, 1985.

SKERRETT, M.; TYERMANN, S. D. A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. **Planta**, v. 192, p. 295-305, 1994.

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 214-219, 1998.

SONG, J.; FENG, G.; TIAN, C. -Y.; ZHANG, F. -S. Osmotic adjustment traits of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron*, *Haloxylon persicum* in field or controlled conditions. **Plant Science**, v. 170, p. 113-119, 2006.

SOUSSI, M.; LLUCH, C.; OCANA, A. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Ciser arietinum*). **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1329-1337, 1998.

SOUZA, R. P.; RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic responses of young cashew plants to varying environmental conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 735-744, 2005.

STEDUTO, P.; ALBRIZIO, R.; GIORIO, P.; SORRENTINO, G. Gas-exchange response and stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation of sunflower under salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 243-255, 2000.

SUDHIR, P.; MURTHY, S. D. S. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. **Photosynthetica**, v. 42, p. 481-486, 2004.

SZABOLCS, I. Soil salinization. In: Pessarakli, M. (ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994, p. 3-11.

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

TAKABE, T.; INCHAROENSAKDI, A.; ARAKAWA, K.; YOKOTA, S. CO₂ fixation rate and rubisco content increase in the halotolerant cyanobacterium, *Aphanothece halophytica*, grown in high salinities. **Plant Physiology**, v. 88, p. 1120-1124, 1988.

TATTINI, M.; GUCCI, R.; CORADESCHI, M. A.; PONZIO, C.; EVERARD, J. D. Growth, gas exchange and ion content in *Olea europaea* plants during salinity stress and subsequent relief. **Physiologia Plantarum**, v. 95, p. 203-210, 1995.

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

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

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.

VAN BREUSEGEM, F.; 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.

VAN WIJK, K. J. Challenges and prospects of plant proteomics. **Plant Physiology**, v. 126, p. 501-508, 2001.

VERBRUGGEN, N.; HUA, X. -J.; MAY, M.; VAN MONTAGU, M. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. **PNAS**, v. 93, p. 8787-8791, 1996.

VICENTE, O.; BOSCAIU, M.; NARANJO, M. Á.; ESTRELLES, E.; BELLÉS, J. M.; SORIANO, P. Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). **Journal of Arid Environments**, v. 58, p. 463-481, 2004.

VIÉGAS, R. A. **Assimilação de nitrogênio e acumulação de solutos em plantas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino**. Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará, 1999. Originalmente apresentada como tese de doutorado.

VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A.; JÚNIOR, 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, p. 216-222, 2001.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 123-132, 2005.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. **Annals of Botany**, v. 88, p. 967-988, 2001.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. -C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, 1996.

XIONG, L.; ZHU, J. -K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 131-139, 2002.

XUE, Z. -Y.; ZHI, D. -Y.; XUE, G. -P.; ZHANG, H.; ZHAO, Y. -X.; XIA, G. -M. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. **Plant Science**, v. 167, p. 849-859, 2004.

YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 615-620, 2005.

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

YEO, A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 915-929, 1998.

YEO, A. Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 159-174, 1999.

YEO, A. R.; Salinity resistance: physiologies and prices. **Physiologia Plantarum**, v. 58, p. 214-222, 1983.

YEO, A. R.; FLOWERS, S.A.; RAO, G.; WELFARE, K.; SENANAYAKE, N.; FLOWERS, T. J. Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oriza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational by pass flow. **Plant Cell and Environment**, v. 22, p. 559-565, 1999.

ZANG, X.; KOMATSU, S. A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. **Phytochemistry**, v. 68, p. 426-437, 2007.

ZHANG, H. -X.; BLUMWALD, E. Transgenic salt-tolerance tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 765-768, 2001.

ZHANG, J.; NGUYEN, H. T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 291-302, 1999.

ZHENG, J.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; FU, J.; GOU, M.; DONG, Z.; HOU, W.; HUANG, Q.; WANG, G. Comparative expression profiles of maize genes from a water stress-specific cDNA macroarray in response to high-salinity, cold or abscisic acid. **Plant Science**, v. 170, p. 1125-1132, 2006.

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

ZHU, J. -K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247–273, 2002.

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

ZIDAN, I.; AZAIZEH, H.; NEWMANN, P. M. Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification? **Plant Physiology**, v. 93, p. 7–11, 1990.

ZISKA, L. H.; SEEMANN, J. R.; DeJONG, T. M. Salinity induced limitations on photosynthesis in *Prunus salicina*, a deciduous tree species. **Plant Physiology**, v. 93, p. 864-870, 1990.

ZÖRB, C.; SCHMITT, S.; NEEB, A.; KARL, S.; LINDER, M.; SCHUBERT, S. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. **Plant Science**, v. 167, p. 91-100, 2004.