

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

JUAN CARLOS ALVAREZ PIZARRO

**CARACTERES FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA TOLERÂNCIA À
SALINIDADE EM CLONES DE CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE**

FORTALEZA - CE

- 2006 -

JUAN CARLOS ALVAREZ PIZARRO

**CARACTERES FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA TOLERÂNCIA À
SALINIDADE EM CLONES DE CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE**

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

**ORIENTADOR:
ENÉAS GOMES FILHO**

FORTALEZA – CE

- 2006 -

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P765c Pizarro, Juan Carlos Alvarez.
Caracteres fisiológicos e bioquímicos da tolerância à salinidade em clones de cajueiro anão precoce / Juan Carlos Alvarez Pizarro. – 2006.
134 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2006.
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.

1. Anacardium occidentale. 2. Fisiologia vegetal. 3. Bioquímica. I. Título.

CDD 572

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.

Juan Carlos Alvarez Pizarro

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 08 / 03 / 2006

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

Dedico, el esfuerzo y el trabajo
de todo este tiempo, a Graciela,
mi esposa, y a Rodrigo, mi hijo.

A ellos, con todo mi cariño.

AGRADECIMENTOS

À Deus, tenho tanto que agradecer-lhe;

Ao professor Dr. Enéas Gomes Filho pelo apoio e orientação constante, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de conhecer e trabalhar na área de fisiologia e bioquímica do estresse salino;

À CAPES, pela bolsa de mestrado a mim concedida, ao CNPq e à FUNCAP, pelo apoio financeiro indispensável para realização do trabalho, à Embrapa Agro-Indústria Tropical, pelo fornecimento das sementes dos clones de cajueiro anão-precoce aqui utilizadas, e ao CENAUREMN, na pessoa do professor Edilberto Rocha Silveira, pelo fornecimento de nitrogênio líquido;

Ao professor Dr. José Tarquínio Prisco, por suas críticas e orientação na elaboração deste trabalho, ao Dr. Marlos Alves Bezerra, pelo apoio e sugestões e ao professor Fernando Monteiro de Paula por sua colaboração nos estudos com os lipídios;

À aluna e amiga Nara Lídia Mendes Alencar, por sua valiosa ajuda e colaboração na realização do presente trabalho;

Aos colegas do grupo de Fisiologia Vegetal: Aiala Amorim, Alexcyane Feijão, Ana Raquel Cardoso, Valdinéia Soares, Carlos Eduardo Braga de Abreu, Elton Camelo Marques, Francisco Valderez A. Guimarães, Franklin Aragão, Paulo H. Alves da Costa, pelo apoio e companheirismo;

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

A todas as pessoas que me apoiaram durante a realização deste trabalho,

Ao Brasil e ao Ceará, minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	13
GLOSSÁRIO	16
ABREVIATURAS	20
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Justificativa	22
1.2. Objetivos	24
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1. Estresse salino	26
2.1.1. Salinidade, crescimento e desenvolvimento	27
2.1.2. Salinidade, fotossíntese e transpiração	30
2.1.3. Salinidade e estresse oxidativo	32
2.1.4. Salinidade e homeostase iônica	34
2.1.5. Salinidade e homeostase osmótica	37
2.1.6. Salinidade e a membrana plasmática	39
2.1.7. H ⁺ -ATPases de membrana plasmática	41
2.1.7.1. Função e características gerais	41
2.1.7.2. Salinidade e a atividade da H ⁺ -ATPase	44
2.2. Aclimação e adaptação das plantas ao estresse salino	47
2.3. O cajueiro	49
2.3.1. Origem e aspectos botânicos	49
2.3.2. Importância econômica	51
2.3.3. Relevância dos porta-enxertos	51

3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1. Experimento I: Respostas dos clones de cajueiro anão-precoce ao estresse salino.....	53
3.1.1. Semeadura, condições de cultivo e coleta das plantas	53
3.1.2. Medidas de crescimento	54
3.1.3. Potencial osmótico, teor de água e succulência foliar	54
3.1.4. Trocas gasosas	56
3.1.5. Teores de íons	56
3.1.6. Determinação dos solutos orgânicos	57
3.1.6.1. Concentração de prolina livre	57
3.1.6.2. Concentração de N-aminossolúveis	58
3.1.6.3. Concentração de carboidratos solúveis	58
3.1.7. Delineamento experimental e análise estatística	59
3.2. Experimento II: Efeitos da salinidade na atividade ATPásica e nos lipídios de membrana plasmática em dois genótipos de cajueiro anão-precoce	59
3.2.1. Isolamento de membrana plasmática	59
3.2.2. Atividade H ⁺ -ATPásica de membrana plasmática	61
3.2.3. Peroxidação dos lipídios de membrana	62
3.2.4. Análise dos lipídios de membrana.....	63
3.2.4.1. Extração dos lipídios de membrana.....	63
3.2.4.2. Cromatografia de camada delgada	63
3.2.4.3. Quantificação dos fosfolipídios	64
3.2.4.4. Esteróis totais de membrana	65
3.2.5. Determinação de proteína na fração membranas.....	66
3.2.6. Delineamento experimental e análise estatística	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1. Análise de crescimento	68
4.1.1. Crescimento foliar	68
4.1.2. Crescimentos da parte aérea e raízes	70
4.2. Trocas gasosas	76
4.3. Relações hídricas e potencial osmótico	81

4.3.1. Teor de água e suculência foliar	81
4.3.2. Potencial osmótico	83
4.4. Solutos inorgânicos e orgânicos	86
4.4.1. Solutos inorgânicos	86
4.4.1.1. Teores de sódio	86
4.4.1.2. Teores de cloreto	89
4.4.1.3. Teores de potássio	91
4.4.1.4. Relação Na^+/K^+	94
4.4.2. Solutos orgânicos	96
4.5. H^+ -ATPase de membrana plasmática	99
4.5.1. Caracterização e pureza das vesículas de membrana plasmática	100
4.5.2. Efeitos da salinidade na atividade enzimática	101
4.6. Peroxidação dos lipídios de membrana plasmática	106
4.7. Lipídios de membrana plasmática	108
4.7.1. Esteróis e fosfolipídios totais	108
4.7.2. Composição dos fosfolipídios	110
5. CONCLUSÕES	115
6. LITERATURA CITADA	116

RESUMO

ALVAREZ PIZARRO, J. C. Caracteres fisiológicos e bioquímicos da tolerância à salinidade em clones de cajueiro anão-precoce. Fortaleza: UFC. 137 p. (Dissertação)

O presente trabalho teve por objetivo estudar as respostas fisiológicas e bioquímicas de clones de cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.) ao estresse salino. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sendo as plântulas cultivadas em vasos plásticos contendo vermiculita. No primeiro experimento, cinco clones de cajueiro anão-precoce foram submetidos aos tratamentos com NaCl a 0 (controle), 8 e 16 dS.m⁻¹ de condutividade elétrica e objetivou selecionar clones com tolerâncias diferenciadas ao estresse salino. Para isso, foram estudados os efeitos da salinidade no crescimento, nas trocas gasosas, no teor de água, na suculência foliar, no potencial osmótico, nas concentrações de prolina, N-aminossolúveis e carboidratos solúveis e nos teores dos íons inorgânicos (Na⁺, Cl⁻ e K⁺). A salinidade reduziu o crescimento das plântulas de todos os clones estudados. Os efeitos inibitórios do NaCl foram mais conspícuos na parte aérea do que nas raízes. O clone CCP 06 foi aquele que apresentou maior redução no crescimento foliar, enquanto os clones BRS 189 e CCP 09 foram os que apresentaram as menores reduções. A salinidade inibiu a mobilização das reservas cotiledonárias, principalmente, na dose mais elevada de sal. A redução no crescimento, pela salinidade, correlacionou-se com a redução na taxa de fotossíntese líquida. Os clones CCP 06 e BRS 189 apresentaram, respectivamente, a maior e a menor redução na taxa fotossintética a 8 dS.m⁻¹. Embora a salinidade tenha reduzido a condutância estomática dos clones de cajueiro anão-precoce, essa redução não foi acompanhada por mudanças nas concentrações internas de CO₂. Os clones estudados não apresentaram alterações, em função da salinidade, no estado hídrico das folhas e raízes, porém, apresentaram reduções no potencial osmótico, favorecendo o ajustamento osmótico e, conseqüentemente, a manutenção da turgescência dos tecidos. Sob condições de estresse salino, os clones BRS 189 e CCP 09 foram os mais eficientes na regulação do transporte do íon Na⁺ para a parte aérea da plântula, acumulando-o nas raízes. Em relação ao Cl⁻, o clone CCP 09 mostrou-se o mais eficiente no controle do transporte desse íon. Porém, CCP 06 foi o clone que mais acumulou ambos os íons tóxicos na parte aérea da planta. Com o aumento da salinidade, os teores de potássio dos clones estudados tiveram seus valores reduzidos apenas nas raízes. Na dose de 8 dS.m⁻¹, o BRS 189 foi o clone que mais aumentou suas concentrações de N-aminossolúveis e prolina no suco radicular. Nesse mesmo nível de sal, a salinidade aumentou a concentração de

carboidratos apenas nos clones CCP 06 e BRS 189. De posse destes resultados, o segundo experimento foi realizado com os clones CCP 06 e BRS 189 que foram os que se mostraram, respectivamente, o menos e o mais tolerante à salinidade. Esse experimento teve por objetivo estudar os efeitos da salinidade (NaCl a 8 dS.m^{-1}) na atividade da H^+ -ATPase e na composição e peroxidação dos lipídios de membrana plasmática isoladas de raízes das plântulas dos dois clones contrastantes. A salinidade estimulou a atividade da H^+ -ATPase apenas no clone tolerante, o BRS 189, sendo esse clone o que apresentou maior conteúdo de esteróis totais e menor relação fosfolipídios totais (PLt)/ esteróis totais (Et), tanto em condições controle como de estresse. Esses resultados foram concordantes com o fato de ter sido o BRS 189 o clone que melhor excluiu o Na^+ da parte aérea. Nesse clone não foram observadas alterações nos teores de malondialdeído, diferentemente do que ocorreu com o CCP 06, cujos teores aumentaram com o estresse salino. A maior proteção da membrana plasmática do clone BRS 189 ao dano oxidativo está de acordo com os maiores acúmulos de prolina e N-aminossolúveis observados nesse clone. Os principais fosfolipídios da membrana plasmática isolada de raízes do clone BRS 189 foram fosfatilglicerol (PG), fosfatidiletalona (PE) e fosfatilserina (PS). A salinidade provocou alterações nas proporções relativas dos fosfolipídios, sendo PE e fosfatidilinositol (PI) os que apresentaram maiores aumentos em relação ao total, enquanto que fosfatidilglicerol (PG) e ácido fosfatídico (PA) foram os que apresentaram maiores reduções. A percentagem de PS, em relação ao total, não foi afetada pela salinidade. No entanto, a relação entre essas mudanças na composição lipídica do BRS 189 pela salinidade e o aumento na atividade da H^+ -ATPase necessita ser melhor investigada.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*, cajueiro anão-precoce, crescimento, fosfolipídios, H^+ -ATPase, membrana plasmática, osmorregulação, peroxidação dos lipídios, relações hídricas, salinidade e trocas gasosas.

ABSTRACT

ALVAREZ PIZARRO, J. C. **Physiological and biochemical characteristics of salt tolerance of early-dwarf cashew seedlings**. Fortaleza: UFC. 137 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. The seeds (nuts) were sown in plastics pots containing vermiculite moistened with either distilled water (control treatment) or NaCl solutions at 8 and 16 dS.m⁻¹ of electrical conductivity (saline treatment), and kept in greenhouse throughout the experimental period. Uniform 28-day-old seedlings were used for the analyses. The first experiment aimed to select, among five clones (CCP 06, CCP 09, CCP 76, Embrapa 51 and BRS 189), the ones showing contrasting salt-tolerance. The effect of salinity on the growth, gas exchange, water content, leaf succulence, osmotic potential and inorganic (Na⁺, Cl⁻, K⁺) and organic (proline, soluble carbohydrates, quaternary ammonium compounds) solute concentration for both salt-sensitive and salt-tolerant clones was studied. Salinity inhibited the growth of all clones studied, being the inhibitory effect on shoot growth more conspicuous than in root growth. Clone CCP 06 leaf area was the most inhibited by salt stress, while clones BRS 189 and CCP 09 leaf areas were the least affected by salinity. Salt stress caused a great decrease in the cotyledon reserve mobilization especially at 16 dS.m⁻¹. Growth reduction was correlated to the reduction in net photosynthetic rate. CCP 06 and BRS 189 showed the greatest and the lowest reduction in photosynthetic rate at 8 dS.m⁻¹, respectively. Although, salinity reduced stomatal conductance, this reduction was not followed by changes in CO₂ internal concentration. The water status, expressed as water content in relation to dry mass, was not changed by salt-stress. Salinity induced the lowering of osmotic potential both in leaves and roots of all clones studied. This osmotic adjustment might have lead to turgor maintenance of those tissues. The concentrations of Cl⁻ and Na⁺ increased with increasing salt stress. Clones BRS 189 and CCP 09 accumulated more Na⁺ in the roots, and this could explain their efficiency in maintaining a lower ion concentration in shoots, i.e. they regulated more efficiently the transport of Na⁺ from roots to shoots. The regulation of Cl⁻ transport to shoots was more efficient in clone CCP 09 than in the others. Salinity did not induce significant changes in leaves and stems K⁺ concentration, but it induced a reduction of K⁺ concentration in roots. Salinity also induced increases of quaternary ammonium compounds and proline concentration in BRS 189 root at

8 dS.m⁻¹. In addition, this level of salinity increased soluble carbohydrates in the root sap especially in clones BRS 189 and CCP 06.

During the second experiment, the effect of salt stress (NaCl at 8 dS.m⁻¹) on the activity of H⁺-ATPase, lipid composition and peroxidation of root plasma membrane of both salt-tolerant (BRS 189) and salt-sensitive (CCP 06) clones were studied. The vanadate-sensitive H⁺-ATPase activity was studied in plasma membrane-enriched vesicles isolated by discontinuous sucrose gradient centrifugation from roots. ATP hydrolyzing activity in this fraction was mostly inhibited by vanadate and scarcely, by azide and molybdate, indicating that it was essentially enriched in plasma membrane vesicles. Salinity induced a 1.3-fold increase in the H⁺-ATPase specific activity in roots of BRS 189 seedlings. Salinity had no appreciable effect on the hydrolytic activity of this enzyme during the growth of CCP 06 seedlings. Likewise, clone BRS 189 roots plasma membrane showed higher sterol content and lower phospholipids/total sterol ratio than clone CCP 06. Both properties could contribute to the decrease in Na⁺ influx or increase in Na⁺ efflux or “exclusion” from roots. This could result in less Na⁺ being transported to the shoot, and thus explaining the higher salt-tolerance of clone BRS 189. The higher degree of root plasma membrane lipid peroxidation of clone, and the lower proline and ammonium quaternary compounds contents of CCP 06 when compared to BRS 189 could also explain the differences in salt-tolerance between the two clones. These organic solutes could protect and stabilize plasma membrane against oxidative stress. Phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine (PS) were the major phospholipids in the plasma membrane from BRS 189 roots. Salinity induced increases in the relative proportions of PE and phosphatidylinositol (PI), while PG and PA were reduced. No changes were detected in PS in relation to control plant. The importance of lipid composition changes on H⁺-ATPase activity must be more studied.

Keywords: *Anacardium occidentale*, early-dwarf cashew growth, salinity, water relations, osmotic adjustment, gas exchange, plasma membrane, phospholipids, lipid peroxidation, H⁺-ATPase.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

- Figura 1.** Plântulas dos clones de cajueiro anão-precoce do Experimento I, com 28 dias após a semeadura em casa de vegetação 55
- Figura 2.** Matéria fresca, matéria seca e área foliares de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino 69
- Figura 3.** Matérias frescas e secas da parte aérea e das raízes de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino..... 71
- Figura 4.** Relações entre a matéria fresca da parte aérea e a das raízes e entre a matéria seca da parte aérea e a das raízes de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino..... 74
- Figura 5.** Matérias fresca e seca dos cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino..... 75
- Figura 6.** Plântulas dos clones CCP 06 e BRS 189 de cajueiro anão-precoce com 28 dias após a semeadura, sob condições controle e de estresse salino 77
- Figura 7.** Fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração e relação entre a concentração de CO₂ interna e externa (C_i/C_e) de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino..... 78
- Figura 8.** Teores de água, com base na matéria seca, de folhas e raízes e suculência foliar de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino 82

Figura 9. Potencial osmótico em folhas e raízes de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	84
Figura 10. Teores de sódio em folhas, caules + pecíolos, raízes e cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	87
Figura 11. Teores de cloreto em folhas, caules + pecíolos, raízes e cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	90
Figura 12. Teores de potássio em folhas, caules + pecíolos, raízes e cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	92
Figura 13. Relação Na^+/K^+ em folhas, caules + pecíolos, raízes e cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	95
Figura 14. Concentrações de prolina, N-aminossolúveis e carboidratos solúveis no suco extraído de raízes de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	97
Figura 15. Atividade ATPásica da fração membranar isolada de raízes de plântulas dos clones CCP 06 e BRS 189 de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	102
Figura 16. Atividade específica da H^+ -ATPase de membrana plasmática isolada de raízes de plântulas dos clones CCP 06 e BRS 189 de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	104

Figura 17. Teores de malondialdeído da fração membranar isolada de raízes de plântulas dos clones CCP 06 e BRS 189 de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	107
Figura 18. Cromatografia em camada delgada dos fosfolipídios de frações enriquecidas de membrana plasmática isolada de raízes de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	111
Figura 19. Composição de fosfolipídios da fração membranar isolada de raízes de plântulas do clone BRS 189 de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino	113
Tabela 1. Teores de fosfolipídios totais (PLt) e de esteróis totais (Et) e relação PLt/Et da fração membranar isolada de raízes de plântulas dos clones CCP 06 e BRS 189 de cajueiro anão-precoce sob condições controle e de estresse salino	109

GLOSSÁRIO

Aclimatação

É o resultado de mudanças fisiológicas e bioquímicas durante o ciclo de vida de um organismo para se ajustar temporalmente a condições ambientais variáveis. Estas características não são transmitidas à descendência.

Adaptação

Qualquer característica ou comportamento natural evoluído, que torna algum organismo capacitado a sobreviver em seu respectivo habitat ou que minimiza os efeitos adversos de ambientes desfavoráveis. As características adaptativas são herdáveis.

Ajuste osmótico

Capacidade de uma célula de manter o seu estado hídrico, quando submetida a condições de estresse. Em condições de estresse salino e hídrico, o ajuste osmótico resulta do acúmulo de sais e íons tóxicos no vacúolo e, de solutos compatíveis com as reações bioquímicas normais no citosol e organelas.

Antiporte

Um tipo de sistema de transporte ativo secundário que realizam o movimento simultâneo ou seqüencial de duas moléculas em direções opostas.

Canais

São proteínas de membrana que se estendem do lado citoplasmático ao lado extracelular e cuja função é a de facilitar o trânsito passivo de determinados solutos. A velocidade de transporte através dos canais é relativamente alta (10^7 s^{-1}) e superior quando comparada à dos carregadores.

Carregadores

São proteínas de transporte localizadas nas membranas que se unem a um soluto, sofrem mudanças conformacionais e liberam o soluto no outro lado da membrana.

Centrifugação diferencial

Método usado para separar organelas, moléculas e partículas subcelulares de acordo com o seu coeficiente de sedimentação. Extratos celulares são submetidos a uma seqüência de centrifugações a velocidades progressivamente mais rápidas. Partículas grandes, como núcleos e cloroplastos, são precipitadas a velocidades relativamente baixas, enquanto partículas pequenas, como os ribossomos, são requeridas velocidades mais altas.

Centrifugação em gradiente de densidade

Centrifugação na qual as moléculas são separadas com base em suas densidades, usando-se um gradiente de concentração de uma solução saturada. Exemplo: solução de sacarose.

Compartimentalização de íons

Mecanismo celular de tolerância ao estresse salino que consiste no transporte e acúmulo de íons tóxicos para o interior do vacúolo, a fim de reduzir seu efeito tóxico sobre a atividade de enzimas do citosol e de organelas celulares e, manter a absorção de água em ambientes salinos.

Condutividade elétrica

Capacidade de conduzir eletricidade, a qual se correlaciona diretamente com a quantidade de íons dissolvidos no extrato de saturação do solo, nas águas de irrigação e nas soluções nutritivas. A condutividade elétrica é expressa em dS.m^{-1} .

Diferença de potencial eletroquímico

É a força que dirige o movimento de solutos através das membranas celulares e que é gerada pelo transporte ativo de prótons do citoplasma para o apoplasto ou para o interior do vacúolo.

Exclusão de íons

Mecanismo celular de tolerância ao estresse salino que consiste no efluxo ou exclusão de íons tóxicos através da membrana plasmática, minimizando os danos provocados ao metabolismo celular.

Fração microsomal

Uma das frações em que os componentes celulares são separados após centrifugação diferencial. É composta de uma mistura de vesículas de membranas plasmática e vacuolar, e de membranas do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e lisossomos.

Homeostase

Propriedade de um sistema aberto, seres vivos principalmente, de regular o seu ambiente interno de modo a manter uma condição estável mediante múltiplos ajustes de equilíbrio dinâmico, controlados por mecanismos de regulação interrelacionados.

Potencial de membrana

É a diferença de potencial elétrico através da membrana, que resulta das diferentes velocidades com que ânions e cátions atravessam a membrana e da atividade das bombas eletrogênicas.

Potencial hídrico

É uma medida da energia livre associada com a água por unidade de volume ($J.m^{-3}$). Essas unidades são equivalentes a unidade de pressão, tais como pascais. O potencial hídrico é uma função do potencial de soluto, do potencial de pressão e do potencial devido à gravidade.

Potencial de soluto ou osmótico

Componente do potencial hídrico, devido aos solutos dissolvidos.

Salinidade

Quantidade de sais solúveis presente na água do mar, nas águas de irrigação e nos perfis do solo, capazes de reduzir, ou até mesmo, impedir o crescimento, desenvolvimento e produção das culturas.

Simporte

Tipo de transporte ativo secundário em que duas substâncias se movem na mesma direção através de uma membrana.

Tolerância

Conjunto de respostas que determinam a habilidade de um organismo vivo (cultivar vegetal) para suportar o estresse abiótico, sem sérias conseqüências para o seu crescimento e desenvolvimento.

Transporte ativo primário

Transporte de um soluto por uma proteína carregadora, estando ligado diretamente a uma fonte de energia. A energia pode prover da hidrólise do ATP (ou do pirofosfato) e de reações de oxido-redução ou da absorção de luz.

Transporte ativo secundário

Transporte ativo de moléculas controlado por transportadores tipo simporte ou antiporte, os quais usam a energia armazenada na força motriz de prótons, como no caso de células vegetais, ou na forma de outro gradiente iônico.

Transporte ativo

Transporte (movimento) de um soluto contra um gradiente de potencial eletroquímico com o consumo de energia metabólica.

Transporte passivo

Transporte (movimento) de um soluto a favor do gradiente de potencial eletroquímico.

Transporte eletrogênico

Transporte ativo de um íon através da membrana, gerando uma diferença de potencial elétrico.

Uniporte

Sistema de transporte passivo que envolve o movimento unidirecional de solutos através de canais.

Vesículas de membrana

Fragmentos de membrana celular e de organelas que, após homogeneização de tecidos, se selam espontaneamente, formando pequenas vesículas. Por serem desprovidas dos constituintes citoplasmático das células intactas, sua atividade metabólica deve-se às enzimas

associadas com a membrana. São utilizadas como sistema modelo para estudar transporte passivo e ativo.

ABREVIATURAS

AF – área foliar

Brij 58 – 20 cetil eter

BSA – albumina sérica bovina

C.E. – condutividade elétrica

CCD – cromatografia em camada delgada

Ci/Ce – relação da concentração interna e externa de CO₂

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilendiamino tetraacético

EGTA – ácido etilenglicol aminoetil tetraacético

Et – esteróis totais

LPC – ácido lisofosfatidilcolina

MDA – malondialdeído

MES – ácido 2-N morfolinoetanosulfônico

MF – matéria fresca

MFF – matéria fresca foliar

MFPA – matéria fresca da parte aérea

MFR – matéria fresca da raiz

MFPA/ MFR – relação entre a matéria fresca da parte aérea e a das raízes

MS – matéria seca

MSF – matéria seca foliar

MSPA – matéria seca da parte aérea

MSR – matéria seca da raiz

MSPA/ MSR – relação entre a matéria seca da parte aérea e a das raízes

PA – ácido fosfatídico

PC – fosfatidilcolina

PE – fosfatidiletanolamina

PG – fosfatidilglicerol

PI – fosfatidilinositol

PLt – fosfolipídios totais

PLt/Et – relação fosfolipídios totais e esteróis totais

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoreto

PS – fosfatidilserina

PVP-40 – polivinilpirrolidona

ROS – espécies reativas de oxigênio

SDS – dodecil sulfato de sódio

SF– suculência foliar

TA – teor de água

TBA – ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

Tris –Tris (hidroximetil) amino metano

Ψ_s – potencial osmótico

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

Os vegetais, mesmo em ambientes naturais, estão sujeitos a estresses, que podem ser de natureza biótica ou abiótica. Os primeiros resultam da ação de seres vivos sobre as plantas, enquanto que os últimos se manifestam graças a fatores de natureza física ou química, tais como: estiagem ou alagamento, temperaturas altas ou baixas, deficiência ou excesso de luz, deficiência de nutrientes ou excesso de sais na solução do solo (BOHNERT *et al.*, 1995). O acúmulo de sais na solução do solo tem inúmeras causas: deposição de sais provocada pela invasão da água do mar, que pode provocar alagamentos de grandes áreas; deposição pelas chuvas, que contém gotículas com sais provenientes da atmosfera ou pela maresia; e, finalmente, pela simples decomposição de rochas ricas em sais (WAISEL, 1972). Além dessas causas naturais, a salinização dos solos pode resultar do manejo inadequado da água ou do solo em áreas agrícolas, especialmente nas regiões áridas e semi-áridas onde predominam a agricultura irrigada. Esse problema tem sido apontado como responsável pela diminuição da produtividade das culturas e até mesmo o abandono de milhões de hectares de terras agricultáveis (CARTER, 1975; GHEYI, 2000; MUNNS, 2002).

Dentre as soluções propostas para minorar ou resolver o problema da salinidade encontram-se: a lavagem dos solos, acompanhada ou não de correção química; o plantio de halófitas, visando sua utilização econômica; o desenvolvimento de técnicas de manejo do solo e da água capazes de minorar os efeitos dos sais nas plantas; e, finalmente, o melhoramento genético (via engenharia genética ou seleção seguida de cruzamentos) de espécies cultivadas, visando à produção de cultivares ou clones tolerantes à salinidade (O'LEARY, 1984; FLOWERS, 2004; SAIRAM & TYAGI, 2004; CHINNUSAMY *et al.*, 2005). O sucesso dessas duas últimas alternativas pressupõe um melhor conhecimento da fisiologia e

bioquímica da tolerância à salinidade (ASHRAF & HARRIS, 2004; FLOWERS, 2004). Entretanto, a identificação dos mecanismos de tolerância ao estresse salino não é tarefa fácil, pois depende da espécie vegetal, do nível, duração e número de exposições ao estresse (BRAY *et al.*, 2000) e, finalmente, da interação com outros tipos de estresse que ocorrem nas condições em que as plantas são cultivadas (MITTLER, 2006). Apesar dessa complexidade, tem-se adotado a estratégia de investigar os mecanismos pelos quais as plantas reagem a determinado tipo de estresse para, em seguida, despender esforços no sentido de entender as interações entre os diversos tipos de estresses bióticos e abióticos.

No trópico semi-árido brasileiro, onde está havendo um aumento progressivo da área irrigada, o problema de salinidade começa a se tornar relevante, pois já foram desativadas grandes áreas agricultáveis devido ao excesso de sais presentes no solo (GHEYI, 2000). Analisando-se o problema do ponto de vista econômico, no semi-árido nordestino a agricultura irrigada tem se mostrado bastante promissora para a produção de frutas e, em menor escala, para a produção de culturas de subsistência e de espécies ornamentais. Dentre as espécies frutíferas perenes predominam a mangueira, a bananeira, a parreira e mais recentemente, o cajueiro (IBGE, 2005; IPECE, 2006).

No Ceará, a cajucultura tem grande relevância, pois este estado é responsável por quase 60% da produção nacional de castanha (PAULA PESSOA *et al.*, 1995). Apesar da maioria da produção de castanha ainda ser proveniente de plantios feitos por semente e sob condições de sequeiro, a oferta de mudas enxertadas, de qualidade superior, e o desenvolvimento da tecnologia de irrigação localizada, fizeram com que alguns produtores comesçassem a implantar novos plantios com cajueiros enxertados e cultivados sob irrigação. Nessas condições, se pode alcançar aumentos em produtividade da ordem de 16 a 17 vezes, comparando-se com a produtividade média atual de castanha do estado (OLIVEIRA, 2002). Partindo-se do princípio que a cajucultura irrigada é promissora, mas apresenta riscos de

salinização dos solos, a sua implantação deve ser acompanhada por pesquisas que visem o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos responsáveis pela tolerância ou sensibilidade nesta espécie. Estes estudos básicos poderão contribuir para o esclarecimento das etapas metabólicas mais relevantes no processo de aclimatação ou adaptação ao estresse salino. 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. Em se tratando de espécies em que a enxertia é o método mais usado de propagação, a tolerância do porta-enxerto é de fundamental importância para o sucesso do plantio em solos salinizados ou naqueles em que se usa água salobra (RIVERO *et al.*, 2003).

1.2. Objetivos

Diante do exposto, pretende-se identificar clones de cajueiro anão-precoce que possuam as maiores diferenças na tolerância ao estresse salino e caracterizar como a salinidade afeta a fotossíntese e o crescimento desses clones. Além disso, pretende-se correlacionar esses efeitos com os processos e componentes da homeostase hídrica (potencial osmótico, teor de água, transpiração, suculência e componentes do ajustamento osmótico) e iônica (teores e distribuição nas diferentes partes da planta dos íons mais relevantes), bem como a composição e peroxidação dos lipídios e atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estresse salino

O estresse salino se refere ao efeito negativo que o excesso de sais presentes na solução do solo exerce sobre o crescimento e desenvolvimento dos vegetais (PLAUT, 1995). Uma planta exposta a altas concentrações de sais enfrenta dois problemas: o primeiro é a absorção de água a partir de um solo com um potencial osmótico baixo e, por via de consequência, um potencial hídrico bem menor do que o da planta; e o segundo resulta do acúmulo de íons tóxicos no citoplasma, os quais inibem muitas das reações metabólicas (SALISBURY & ROSS, 1992). Esse desequilíbrio osmótico e iônico leva a uma redução no crescimento da planta, a uma baixa absorção de nutrientes, à inibição da fotossíntese e a danos a nível celular, tais como a desorganização do sistema de membranas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - do Inglês, *reactive oxygen species*) e o acúmulo de metabólitos tóxicos (NEUMANN, 1997; HASEGAWA *et al.*, 2000).

A supressão do crescimento pela salinidade ocorre em todas as plantas, mas os níveis de tolerância e o grau de redução do crescimento variam entre as diferentes espécies vegetais e entre cultivares de uma mesma espécie (GREENWAY & MUNNS, 1980; MUNNS, 2002; PARIDA & DAS, 2005). De acordo com essa diversidade genética com relação a tolerância à salinidade, as plantas têm sido classificadas em halófitas e glicófitas (GREENWAY & MUNNS, 1980). As halófitas são aquelas que crescem em solos salinos e toleram altas concentrações de sais, enquanto que as glicófitas, entre as quais se encontram a maioria das plantas cultivadas, são sensíveis aos sais e não toleram longa ou mesmo breve exposição a um ambiente salino. Mesmo dentro das glicófitas existe uma grande variabilidade entre as

espécies, desde as que são extremamente sensíveis até aquelas com maior nível de tolerância (GREENWAY & MUNNS, 1980).

2.1.1. Salinidade, crescimento e desenvolvimento

A inibição do crescimento foliar é uma das respostas iniciais das plantas ao estresse salino (MUNNS & TERMAAT, 1986; ZISKA *et al.*, 1990; MUNNS, 2002). A injúria provocada pelo acúmulo excessivo dos íons tóxicos, Na⁺ e Cl⁻, se manifesta como clorose marginal e surgimento de zonas necróticas (MAAS, 1996) que contribuem para a aceleração dos processos de senescência e abscisão foliares (MUNNS, 1993).

As plantas que crescem em solos salinizados, onde predomina NaCl, freqüentemente apresentam folhas mais grossas e suculentas (WAISEL *et al.*, 1986). Alguns autores acreditam que o aumento na espessura foliar deva-se a uma elevação no número de camadas de células do mesófilo ou então a um incremento no volume celular, fato observado em plantas dos gêneros *Atriplex*, *Citrus* e *Gossypum hirsutum* (LONGSTRETH & NOBEL, 1979).

De acordo com alguns autores, a salinidade reduz mais o crescimento da parte aérea que o do sistema radicular (MUNNS, 2002). Apesar dessa menor redução do crescimento das raízes, as plantas alteram consideravelmente sua capacidade para absorver água e nutrientes essenciais a partir da solução do solo (NEUMANN, 1997). De acordo com Moya *et al.* (1999), a alteração da relação raiz/parte aérea em plântulas de *Citrus* é um importante fator que determina a tolerância destas plantas sob condições de estresse salino, pois contribui para a regulação da absorção passiva de cloreto e seu acúmulo nas folhas.

Muitas controvérsias têm sido levantadas em relação aos mecanismos fisiológicos primários responsáveis pela redução do crescimento das plantas quando submetidas à

salinidade. Uma hipótese, formulada por Munns (1993), propõe que a inibição do crescimento caracteriza-se por ser uma resposta bifásica. Na primeira fase, que se manifesta em uma escala de tempo de horas ou dias, a redução no crescimento vegetal resulta do efeito osmótico dos sais presentes no solo (estresse hídrico). Nessa etapa, diferentes cultivares de uma mesma espécie mostram uma redução similar no crescimento, não havendo respostas celulares e fisiológicas contrastantes que permitam a discriminação de cultivares com tolerâncias diferenciadas à salinidade. A segunda fase inicia-se após semanas ou meses de exposição ao estresse salino, quando os sais absorvidos começam a acumular-se nos diferentes tecidos da planta, provocando desbalanço nutricional e toxicidade iônica sobre diferentes processos fisiológicos. Contudo, a redução no crescimento não se dá com a mesma intensidade entre os cultivares, ocorrendo respostas celulares e fisiológicas diferentes que permitem que alguns cultivares se adaptem ao estresse salino melhor do que outros. Portanto, quando há o desbalanço nutricional e a toxicidade iônica, podem ser observadas diferenças genotípicas que facilitam a seleção de cultivares com tolerância aos sais. De acordo com essas observações, Munns (1993) propõe que os esforços para conseguir plantas com maior tolerância aos sais devam ser dirigidos para o estudo dos mecanismos envolvidos na regulação da homeostase iônica.

Neumann (1997) reuniu um conjunto de evidências que contradizem a hipótese anterior, sugerindo que existe diversidade genotípica entre cultivares em relação às respostas fisiológicas ao efeito osmótico dos sais, sem necessariamente envolver a toxicidade salina. De acordo com Zhu (2001), a redução na turgescência celular provocada pelo estresse salino, é uma causa importante para explicar a diminuição no crescimento das plantas, pois tem influência direta nos processos de expansão e divisão celular.

A tolerância ou a sensibilidade aos sais varia com o estágio de desenvolvimento do vegetal no qual o estresse salino é aplicado. Segundo Shannon *et al.* (1994), citado por

Kozlowski (1997), as plantas lenhosas usualmente mostram maior tolerância aos sais durante a fase de germinação do que durante a de estabelecimento da plântula, quando a sensibilidade aos sais aumenta. Além disso, essas plantas tornam-se progressivamente mais tolerantes à medida que vão atingindo o estágio adulto até a etapa reprodutiva, embora a salinidade possa ter um efeito negativo durante a floração (antese).

A maioria das árvores frutíferas como *Annona cherimola*, *Mangifera indica*, *Persea americana*, *Musa paradisiaca*, *Prunus persica* e várias espécies do gênero *Citrus*, são sensíveis a níveis de salinidade iguais a 1 dS.m^{-1} de condutividade elétrica do extrato de saturação (CEex). Outras espécies são moderadamente sensíveis, pois toleram níveis de salinidade equivalentes a 3 dS.m^{-1} , destacando-se *Carica papaya* e *Vitis vinifera*. As espécies *Annona camosus*, *Ficus carica* e *Psidium guajava* são consideradas moderadamente tolerantes, pois podem manter seu crescimento em níveis de salinidade de 6 dS.m^{-1} . *Phoenix dactilifera* é a árvore frutífera mais tolerante, pois suporta níveis de CEex de até 10 dS.m^{-1} (EBERT *et al.*, 1997).

2.1.2. Salinidade, fotossíntese e transpiração

De acordo com diversos autores, a salinidade inibe os processos de fotossíntese e transpiração (ROBINSON *et al.* 1997; TAIZ & ZEIGER, 2002). Essa inibição tem sido atribuída a reduções na condutância estomática (BRUGNOLI & LAUTERI, 1991) e no conteúdo total de clorofila e carotenóides (GREENWAY & MUNNS, 1980; PARIDA & DAS, 2005), bem como ao acúmulo nos cloroplastos dos íons Na^+ e/ou Cl^- , que afetam desfavoravelmente os processos bioquímicos e fotoquímicos envolvidos na fotossíntese (PLAUT, 1995; TAIZ & ZEIGER, 2002). Apesar desses efeitos da salinidade serem observados na maioria das plantas, existem relatos de que a salinidade (NaCl a 100 mM)

estimula a fotossíntese na halófito *Bruguiera parviflora*, com correspondente aumento no seu crescimento (PARIDA *et al.*, 2004).

O fechamento estomático, sob condições de salinidade, desempenha um papel adaptativo porque controla o transporte de íons tóxicos até os tecidos fotossintetizantes, evitando, ao mesmo tempo, a perda de água por transpiração (NEUMANN, 1997; ROBINSON *et al.*, 1997). No entanto, Iyengar & Reddy (1996) citado por Parida & Das (2005), acreditam que essa redução no fluxo transpiratório tem conseqüências negativas para a planta porque afeta os sistemas de captação de luz e os centros fotoquímicos de reação no cloroplasto. Além disso, Hasegawa *et al.* (2000) apontaram que, pela necessidade da planta fixar o CO₂, essa seria uma estratégia insustentável a longo prazo.

Allakhverdiev *et al.* (2000), estudando os efeitos osmóticos do sorbitol sobre a atividade fotossintética da cianobactéria *Synechococcus*, observaram que a redução do potencial hídrico é responsável pelo efluxo de água através de canais na membrana plasmática (aquaporinas), provocando redução no espaço intracelular e acúmulo de íons que inibem a atividade dos fotossistemas I e II. O déficit hídrico provocado pelos estresses hídrico e salino, aumenta as concentrações de ânions divalentes (HPO₄²⁻ e SO₄²⁻) nos cloroplastos e podem inibir enzimas tais como a Rubisco (KAISER, 1987). Assim, esses autores concluíram que a atividade fotossintética decresce quando o potencial hídrico celular é reduzido. No entanto, outras plantas, submetidas à salinidade, são capazes de manter o potencial hídrico da folha similar ao observado em plantas não salinizadas, concluindo-se que a redução na assimilação de CO₂ é devida mais ao efeito específico dos íons do que aos efeitos osmóticos da salinidade (BAÑULUS & PRIMO-MILLO, 1992).

Na maioria das halófitas e glicófitas, o controle do fechamento estomático é alterado pela inabilidade das células-guarda em excluir, principalmente, os íons sódio, provocando distúrbios nas relações hídricas da planta (PLAUT, 1995; ROBINSON *et al.*, 1997). Porém,

poucas espécies, principalmente as do gênero *Citrus*, apresentam maior sensibilidade ao cloreto, sendo a condutância estomática e a fotossíntese pouco afetadas pela presença do sódio (BAÑULUS & PRIMO-MILLO, 1992).

Ball *et al.* (1987) mostraram que a redução nos teores de potássio pelo estresse salino altera o funcionamento do fotossistema II, causando diminuição na evolução de oxigênio. Todavia, outros autores mostraram que, embora os níveis de potássio nas folhas não tenham sido afetados pela salinidade, as plantas apresentaram redução na taxa fotossintética, indicando que a deficiência de potássio não é um fator significativo no processo de absorção de CO₂ em algumas plantas (WALKER *et al.*, 1993, citado por STOREY & WALKER, 1999).

2.1.3. Salinidade e estresse oxidativo

O estresse salino induz um estresse oxidativo secundário, fato que agrava ainda mais o problema do excesso de íons e do déficit hídrico, intensificando as alterações fisiológicas e bioquímicas prejudiciais ao metabolismo vegetal (MANSOUR & SALAMA, 2004). O fechamento estomático, promovido pelo ácido abscísico, leva a uma diminuição na concentração interna de CO₂ e aumento na de O₂. Essas condições, associadas à baixa disponibilidade de NADP⁺ para captar os elétrons provenientes do fotossistema I, favorece a formação de ROS nos cloroplastos e mitocôndrias devido ao desvio dos elétrons para o oxigênio molecular (El-BAKY *et al.*, 2003; ASHRAF & HARRIS, 2004). Nos cloroplastos, as ROS podem ser geradas pela transferência direta da energia de ativação da clorofila para produzir o oxigênio *singlete*, ou por uma redução monovalente do oxigênio molecular pelo fotossistema I, como na reação de Mehler (ASADA, 1999). As ROS produzidas durante o metabolismo normal ou sob condições de estresse são: o radical superóxido (O₂^{•-}), o peróxido

de hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxila (OH^\bullet) e o oxigênio *singleto* (O_2^\uparrow) (MITTLER, 2002).

O radical superóxido é também produzido enzimaticamente na membrana plasmática pela oxidase do NADPH (HAO *et al.*, 2006). Essa enzima transfere elétrons do NAD(P)H citosólico para o O_2 , formando o radical superóxido, seguido de sua dismutação a H_2O_2 e O_2 . O radical OH^\bullet pode ser gerado pela reação do H_2O_2 com o Fe^{2+} , na chamada reação de Haber-Weiss (McKERSIE & LESHEM, 1994). O oxigênio *singleto* é formado, principalmente nos processos fotoquímicos do cloroplasto (EDREVA, 2005). As ROS, geradas sob condições de estresses hiperosmótico e hiperiônico, são altamente reativas e provocam sérias alterações no metabolismo celular, causando peroxidação dos lipídios de membrana, oxidação de proteínas e ácidos nucléicos e danos físicos na estrutura do fotossistema II, podendo ocasionar morte celular (McKERSIE & LESHEM, 1994; MELONI *et al.*, 2003).

A peroxidação dos lipídios da membrana tem início com a remoção de um átomo de hidrogênio do grupo metileno dos ácidos graxos poliinsaturados, resultando na formação de um radical livre lipídico. Esse radical sofre rearranjo em suas duplas ligações produzindo dienos conjugados, que podem reagir com o oxigênio molecular, originando um radical peroxilipídico o qual pode promover a remoção de um átomo de hidrogênio de um lipídio adjacente para formar um hidroperoxilipídio ou um endoperoxilipídio. A formação de um endoperoxilipídio a partir de ácidos graxos poliinsaturados, contendo pelo menos três grupos metilenos alternados por duplas ligações, pode conduzir à formação de malondialdeído (MDA) (BUEGE & AUST, 1978).

A quantidade de lipídios peroxidados aumenta gradualmente com o aumento da salinidade (GOSSETT *et al.* 1994). Em plantas lenhosas e frutíferas, o teor de MDA é freqüentemente utilizado como marcador do grau de dano oxidativo, observando-se maior acúmulo em genótipos que mostram menor tolerância a altos níveis de sais (SUDHAKAR *et*

al., 2001; ARBONA *et al.*, 2003; MELONI *et al.*, 2003). Shalata & Tal (1998) observaram que espécies silvestres de tomateiro (*Lycopersicon pennellii*) têm níveis baixos de MDA, que não aumentam significativamente com o incremento da salinidade, como acontece com as espécies cultivadas. A melhor proteção dessa espécie vegetal contra o dano oxidativo deve-se à expressão constitutiva das enzimas dismutase do superóxido (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX) e à indução da catalase (CAT) e da redutase do monodesidroascorbato (MDHAR).

2.1.4. Salinidade e homeostase iônica

Em condições fisiológicas normais, as células vegetais mantêm uma alta relação K^+/Na^+ no citosol, sendo as concentrações de K^+ e Na^+ da ordem de 100-200 mM e 1-10 mM, respectivamente (BINZEL *et al.*, 1988; SERRANO *et al.*, 1999). A concentração de cloreto está em torno de 10-20 mM (TYERMANN & SKERRETT, 1999). A regulação desse equilíbrio iônico depende do transporte desses íons através das membranas celulares, sendo importante para a manutenção dos processos metabólicos que controlam o crescimento e o desenvolvimento da planta. Quando as células vegetais são expostas à salinidade, a cinética do transporte e a concentração dos íons nas células são alteradas (BINZEL *et al.*, 1988).

O desbalanço iônico induzido pelo excesso de Na^+ têm sido atribuído a sua interferência na absorção de outros cátions, especificamente a dos íons K^+ e Ca^{2+} (RAINS & EPSTEIN, 1967; WATAD *et al.*, 1991). Os transportadores que controlam a absorção de K^+ podem transportar os íons Na^+ (EPSTEIN *et al.*, 1963), sugerindo que os sistemas para a absorção de ambos os cátions são similares (NIU *et al.*, 1995).

Em ambientes salinos, o influxo passivo do sódio segue o gradiente de concentração e é favorecido pelo potencial negativo de membrana (NIU *et al.*, 1995; ZHU, 2003). Porém,

diferentes vias têm sido propostas como responsáveis pela absorção de Na^+ . Rubio *et al.* (1995) demonstraram que os transportadores de K^+ de alta afinidade (HKT, *high-affinity K⁺ transporter*) podem funcionar como transportadores do tipo simporte Na^+/K^+ . Blumwald *et al.* (2000) propuseram que os transportadores de K^+ de baixa afinidade (*low-affinity K⁺ transporter*), tais como o AKT1 (*Arabidopsis K⁺ transporter 1*), operam quando as concentrações de Na^+ no meio externo são relativamente altas. AKT1 funciona como um canal retificador de ingresso de K^+ , ativando seu influxo quando a membrana plasmática está em um estado despolarizado e exibindo uma seletividade K^+/Na^+ alta em concentrações fisiológicas de ambos os íons. Outras vias de absorção têm sido sugeridas, estando controladas por canais catiônicos retificadores de saída (SCHACHTMAN *et al.* 1991) e por canais catiônicos não seletivos (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).

Em condições normais de crescimento, um potencial de membrana negativo é uma barreira termodinâmica para a absorção de cloreto (NIU *et al.*, 1995; MOYA *et al.*, 1999). Em consequência, sua absorção pode depender de um processo de transporte ativo controlado por um simporte Cl^-/H^+ (POOLE, 1988, citado por NIU *et al.*, 1995) ou por um transporte passivo através de canais permeáveis ao nitrato (SKERRETT & TIERMANN, 1994). Tyerman & Skerret (1999) apresentaram evidências mostrando que a absorção de cloreto, em *Citrus*, é um processo ativo quando as plantas crescem na presença de baixas concentrações de sais, porém torna-se um processo passivo quando em elevadas concentrações de sais. Nesta última situação, o potencial de membrana pode ser menos negativo do que o potencial de equilíbrio de cloreto favorecendo a sua absorção passiva nas raízes. Estes mesmos autores acreditam que, em baixos níveis de sais, a concentração de cloreto no citosol depende do balanço entre

seu influxo ativo, controlado pelo simporte Cl^-/H^+ , e seu efluxo através das membranas vacuolar e plasmática.

Como consequência do acúmulo de Na^+ e Cl^- no ambiente radicular, a absorção de nutrientes essenciais como K^+ , Ca^{2+} e NO_3^- é reduzida, provocando desbalanço nutricional (BLUMWALD, *et al.* 2000; PARANYCHIANAKIS & CHARTZOULAKIS, 2005). Quando a concentração de Na^+ eleva-se no citosol, a deficiência dos íons K^+ e Ca^{2+} afeta a permeabilidade e a estabilidade da membrana plasmática, o que pode ser evidenciado por um aumento no vazamento de eletrólitos (RAINS & EPSTEIN, 1967; CRAMER *et al.*, 1985).

Não há evidências de que haja adaptação de enzimas à presença de elevadas concentrações salinas (FLOWERS *et al.*, 1977). Portanto, os mecanismos de tolerância à salinidade devem envolver a manutenção de baixos níveis de sais no citosol. A remoção do Na^+ do citosol para fora da célula ou sua compartimentalização no vacúolo é realizada pela atividade de transportadores tipo antiporte Na^+/H^+ , nomeados SOS1 e NHX1, presentes nas membranas plasmática e vacuolar, respectivamente (APSE *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2000). A expressão dos transportadores SOS1 e NHX1, em *Arabidopsis thaliana*, induzida pela salinidade está de acordo com seus papéis na adaptação ao estresse salino (GAXIOLA *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2000). A atividade desses transportadores depende do gradiente de H^+ gerado pela H^+ -ATPase de membrana plasmática ou pela H^+ -ATPase e pirofosfatase vacuolares (BLUNWALD *et al.*, 2000). Gaxiola *et al.* (2001) demonstraram, através de experimentos realizados com *A. thaliana*, que a superexpressão do gene *AVP1*, que codifica para a pirofosfatase vacuolar, confere às plantas maior capacidade de acúmulo de solutos inorgânicos e, conseqüentemente, maior tolerância às condições de seca e de estresse salino.

A ativação do antiporte Na^+/H^+ da membrana plasmática, SOS1, é controlada pela atividade das proteínas SOS2 e SOS3 que, em conjunto, constituem uma via de sinalização chamada SOS (*salt overly sensitive*). Esta via de sinalização regula a expressão e a atividade

de vários transportadores para manter a homeostase do Na^+ , em condições de estresse salino. SOS3 foi identificada como uma proteína ligante de cálcio que está ancorada na membrana plasmática através de uma molécula de ácido mirístico (ISHITANI *et al.*, 2000) e SOS2 é uma quinase que fosforila resíduos de serina e treonina. Durante o estresse salino, o aumento do cálcio citosólico é percebido pela SOS3, a qual interage e ativa a SOS2 que, por sua vez, ativa vários transportadores que controlam o transporte de íons tais como o SOS1.

A compartimentalização vacuolar de cloreto é uma adaptação essencial para a tolerância ao estresse salino (NIU *et al.*, 1995). Esse processo pode ser controlado através de transportadores dirigidos pelo fluxo eletroforético gerado pelas bombas de prótons através da membrana vacuolar (NIU *et al.*, 1995; SZE *et al.*, 1999). O cloreto pode ser compartimentalizado no vacúolo através de seu cotransporte com o íon H^+ , já que a principal força termodinâmica é o gradiente de pH. Um sistema antiporte H^+ /ânion também foi proposto para o transporte, que operaria na compartimentalização do Cl^- no vacúolo (REA & SANDERS, 1987).

2.1.5. Salinidade e homeostase osmótica

O ajuste osmótico, através do acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos, é um mecanismo que as plantas desenvolveram para obter água do ambiente externo, que possui baixo potencial hídrico (TAIZ & ZEIGER, 2002). De acordo com Binzel *et al.* (1988), a compartimentalização dos solutos inorgânicos no vacúolo, é um componente do ajustamento osmótico necessário para a aclimatação ou adaptação à salinidade. Por causa dessa compartimentalização dos íons, solutos orgânicos compatíveis com as atividades metabólicas celulares são sintetizados e acumulados no citosol, a fim de ajustar seu potencial hídrico com aquele do vacúolo (TAIZ & ZEIGER, 2002; TESTER & DAVENPORT, 2003). Os solutos

compatíveis são compostos de baixo peso molecular, altamente solúveis, neutros ou *zwitteriônicos* que incluem: aminas quaternárias ou betainas (glicinabetaina, prolinabetaina), polióis (manitol, onitol, sorbitol), aminoácidos livres, o iminoácido prolina e carboidratos livres (sacarose, frutose, trealose) (ASHRAF & HARRIS, 2004). Além de sua participação no ajustamento osmótico, esses solutos orgânicos podem proteger processos fisiológicos como a fotossíntese e ter um papel na estabilização da estrutura de proteínas e membranas, e na remoção de ROS (HASEGAWA, *et al.* 2000; CHEN & MURATA, 2002).

Existem várias possibilidades para o ajustamento osmótico, dependendo, evidentemente, do tipo de planta e da maneira como o potencial hídrico do solo é diminuído (FLOWERS *et al.*, 1977). As halófitas se ajustam osmoticamente através de um eficiente mecanismo de compartimentalização dos íons Na^+ e Cl^- no vacúolo. Entretanto, algumas glicófitas, com tolerância moderada ao estresse salino, têm capacidade limitada de compartimentalizar esses íons, os quais se concentram em níveis elevados no apoplasto e citosol foliar, provocando desidratação e toxicidade iônica (HASEGAWA *et al.*, 2000; MUNNS, 2002). O ajustamento osmótico, pela síntese de solutos orgânicos e pela compartimentalização dos íons, tem um custo energético relativamente alto para a planta (YEO, 1983). Portanto, em virtude das plantas investirem muitos recursos para combater o estresse, há uma marcada redução em seu crescimento (ZHU, 2001).

2.1.6. Salinidade e a membrana plasmática

No contexto celular, as membranas são as estruturas mais importantes para manter o equilíbrio iônico e osmótico. Os transportes ativos, primário e secundário, que são controlados por bombas, canais e carregadores localizados nas membranas regulam a composição iônica do citoplasma (BLUMWALD *et al.*, 2000; HASEGAWA *et al.*, 2000; TESTER &

DAVENPORT, 2003), sendo estes processos de crucial importância para a adaptação das plantas ao estresse salino (NIU *et al.*, 1995).

Como se sabe, a permeabilidade da membrana plasmática depende das propriedades da matriz lipídica e da interação lipídio-proteína (TAIZ & ZEIGER, 2002). Durante o estresse salino, tem sido mostrado que as membranas plasmáticas sofrem mudanças na sua composição e estrutura que afetam suas propriedades de permeabilidade e transporte (MANSOUR & SALAMA, 2004). No entanto, a importância e o significado que estas mudanças exercem na fisiologia da planta, sob condições de estresse salino, são de difícil interpretação. Kuiper (1985) propôs que as mudanças na composição dos lipídios de membrana podem ter um papel adaptativo durante o estresse, ou serem apenas o resultado de reações de hidrólise induzidas pela salinidade. As evidências em favor do papel adaptativo têm por base as alterações nas propriedades físicas das espécies lipídicas envolvidas, que conferem às membranas uma maior estabilidade e menor fluidez e permeabilidade aos íons (KUIPER, 1985; WU *et al.*, 1998).

As membranas das células vegetais apresentam teores elevados dos esteróis sitosterol, campesterol e estigmasterol, sendo baixos os teores de colesterol (BRISKIN, 1995). Diferentes autores têm salientado o papel dos esteróis livres em plantas submetidas a estresse salino, sendo o aumento em seus teores correlacionado com maiores níveis de tolerância à salinidade (DOUGLAS & WALKER, 1984; BLITS & GALLAGHER, 1990). Maior preponderância de esteróis com estrutura planar, em relação àqueles com estrutura menos planar, permite as plantas ajustarem-se a condições ambientais adversas (SURJUS & DURAND, 1996; QUARTACCI *et al.*, 2002). Esses lipídios se intercalam entre os fosfolipídios adjacentes, com os quais interagem fisicamente, limitando o movimento das cadeias acílicas, e assim, diminuindo a fluidez e permeabilidade da membrana (ASHCROFT *et al.*, 1983; SINENSKY *et al.*, 1979).

Na halófito *Spartina patens*, há uma predominância de esteróis livres em relação aos fosfolípidios, quando cultivada tanto em condições controle quanto de estresse salino. No entanto, as mudanças na composição dos esteróis livres não provêm evidências para sustentar a hipótese de que aqueles com estrutura mais planar contribuam para a estabilidade e permeabilidade da membrana (WU *et al.*, 1998). Por outro lado, Kerkeb *et al.* (2001), avaliando o efeito da salinidade em cultura de células de tomate resistentes e sensíveis, observaram que o conteúdo de esteróis livres não era significativamente alterado não sendo, portanto, um indicador de tolerância ao estresse salino.

Espécies tolerantes e sensíveis à salinidade mostram um incremento no grau de insaturação dos ácidos graxos dos fosfolípidios de membrana durante o estresse salino, sendo um efeito que decresce a permeabilidade da membrana aos íons Na^+ e Cl^- (WU *et al.*, 1998; KERKEB *et al.* 2001).

Os lípidios estimulam a atividade de muitas enzimas de membrana plasmática que são determinantes da tolerância ao estresse salino. Cooke & Burden (1990) e Kasamo (2003) mostraram que a atividade das H^+ -ATPases é estimulada principalmente pelos fosfolípidios fosfatidilserina (PS) e fosfatidilcolina (PC), sendo esta ativação dependente do grau de insaturação e do comprimento da cadeia acíclica. Ensaio, *in vitro*, mostraram que as fosfolipases do tipo A_2 e seus produtos de reação, o ácido lisofosfatidilcolina e ácidos graxos livres, estimulam a cinética das H^+ -ATPases, aumentando tanto a velocidade máxima da reação, quanto a afinidade da enzima por seu substrato, o ATP (PALMGREN *et al.*, 1988; PEDCHENKO *et al.*, 1990). Mudanças na enzima para uma forma de alta afinidade, por modificações no ambiente lipídico, foram propostas como possível mecanismo envolvido nos processos de adaptação ao estresse e à osmorregulação em vegetais (CHAPMAN, 1998; RYU, 2004).

2.1.7. H⁺-ATPases de membrana plasmática

2.1.7.1. Função e características gerais

O controle da absorção seletiva de nutrientes, com rejeição de íons tóxicos presentes no meio extracelular através da membrana plasmática, depende da enzima H⁺-ATPase (MORSOMME & BOUTRY, 2000; SONDERGAARD *et al.*, 2004). Essa enzima gera um potencial eletroquímico que ativa o sistema de transporte secundário, o qual é constituído por proteínas tipo canais e carregadores que controlam o transporte de íons e nutrientes, regulando a homeostase iônica celular (MICHELET & BOUTRY, 1995).

As H⁺-ATPases são enzimas que funcionam como transdutores de energia metabólica, pois acoplam a energia liberada pela hidrólise do ATP para promover o transporte ativo de prótons para o espaço extracelular ou apoplasto. Esta função básica das H⁺-ATPases gera um gradiente de carga elétrica e de massa chamado *gradiente eletroquímico* ou energia quimiosmótica (ARANGO *et al.*, 2003; SCARBOROUGH, 2003). Em uma célula vegetal típica, o potencial de membrana tem um valor compreendido entre -150 a -200 mV com o lado da membrana voltado para o citosol carregado negativamente e uma diferença de pH entre o citoplasma e o apoplasto de aproximadamente duas unidades, sendo ácido o pH na região do apoplasto (MICHELET & BOUTRY, 1995; SZE, *et al.*, 1999).

As H⁺-ATPases de células vegetais pertencem à família das ATPases do tipo P, pois sua atividade é regulada por fosforilação/desfosforilação de um resíduo de aspartato durante seu ciclo catalítico. O esquema do ciclo de reação, como descrito por Morsomme & Boutry (2000), indica que a enzima passa por dois estádios conformacionais, denominados de E1 e E2, os quais mostram diferenças em afinidades pelos íons (prótons) a serem transportados e na reatividade do sitio ao qual se liga o nucleotídeo. Na conformação E1, a H⁺-ATPase tem alta afinidade por prótons e pela molécula de ATP, cuja hidrólise fornece a energia que

provoca uma mudança conformacional para a forma E2. O estado conformacional E2, apresenta um grupo fosfato ligado a sua estrutura e se caracteriza por ter menor afinidade por prótons, os quais são liberados no espaço extracelular. O vanadato, um análogo do fosfato, atua como um inibidor altamente efetivo das H⁺-ATPases, impedindo a formação do intermediário fosforilado (SZE, 1985; KÜHLBRANDT, 2004).

Estruturalmente, estas enzimas caracterizam-se por ter uma massa molecular de 100-120 kDa e por estarem organizadas na membrana plasmática como dímeros ou oligômeros (SONDERGAARD *et al.*, 2004). O modelo mais aceito que descreve a estrutura das bombas de H⁺ de plantas revela a existência de 10 hélices transmembranares com quatro domínios citoplasmáticos: 1. uma região amino-terminal; 2. um *loop* citoplasmático menor, provavelmente envolvido nas mudanças conformacionais da enzima; 3. um *loop* citoplasmático maior, contendo os resíduos de aspartato a serem fosforilados durante o ciclo catalítico e os domínios que ligam o ATP e 4. uma região C-terminal ou *domínio R* com propriedades reguladoras da atividade enzimática. Esse último domínio, com aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, está presente apenas nas H⁺-ATPases de plantas e fungos e ausente em outras ATPases do tipo P (PORTILLO, 2000, KÜHLBRANDT, 2004). Palmgren *et al.* (1990), mostraram que a remoção do *domínio R* por incubação das vesículas de membrana plasmática, com o lado citoplasmático da membrana voltado para o exterior (orientação *inside-out*), com tripsina, aumentava marcadamente a atividade hidrolítica do ATP e a translocação de H⁺ pelas H⁺-ATPases.

As H⁺-ATPases de membrana plasmática de plantas são codificadas por uma família multigênica. O seqüenciamento completo dos genomas da dicotiledônea *Arabidopsis thaliana* e da monocotiledônea *Oriza sativa* resultou na identificação de onze e dez seqüências codificantes para essas enzimas, respectivamente (PALMGREN, 2001; BAXTER *et al.*, 2003). A existência de vários genes codificando para diferentes isoformas levanta a

possibilidade de que algumas bombas de H^+ possam ter funções redundantes. Porém, também tem sido sugerido, que a diversidade de isoformas existentes tem estreita relação com o importante papel que cada uma delas desempenha na fisiologia da planta (MICHELET & BOUTRY, 1995; MORSOMME & BOUTRY, 2000).

A expressão simultânea de vários genes, em tecidos e órgãos da planta, tem dificultado os estudos bioquímicos com o objetivo de caracterizar uma única isoforma de H^+ -ATPase envolvida em um determinado processo fisiológico. As variações observadas em certos parâmetros enzimáticos, tais como o K_m , podem ser explicadas pela existência de várias isoformas da enzima com propriedades cinéticas diferentes. Palmgren & Christensen (1994) estudaram três isoformas de H^+ -ATPase isoladas de *Arabidopsis thaliana*, AHA1, AHA2 e AHA3, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de expressão heteróloga, e mostraram que essas isoformas apresentavam afinidades diferentes pelo substrato. Morsomme & Boutry (2000) propuseram que essas diferenças enzimáticas podem estar relacionadas a propriedades funcionais distintas de cada isoforma, podendo conferir vantagem adaptativa em determinadas condições ambientais. Portanto, os resultados da cinética destas enzimas quando analisados a partir de um órgão particular da planta devem ser interpretados com precaução, tendo em consideração que os dados refletem a contribuição de muitas isoformas que podem ser expressas simultaneamente no material biológico estudado.

No que diz respeito às propriedades enzimáticas, as H^+ -ATPases têm um pH ótimo de 6,6, valor que está abaixo do pH fisiológico do citoplasma da célula vegetal, usualmente ao redor de 7,2 a 7,5. Os valores de K_m para o substrato da enzima, o complexo MgATP, oscilam entre 0,3 e 1,4 mM, sendo os valores de atividade específica em vesículas de membranas plasmáticas purificadas usualmente da ordem de 1 a 2 $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Prot}\cdot\text{min}^{-1}$ (MICHELET & BOUTRY, 1995; MORSOMME & BOUTRY, 2000). Alguns cátions

estimulam a atividade ATPásica basal na seguinte seqüência: $K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$ (SZE, 1985).

2.1.7.2. Salinidade e a atividade da H^+ -ATPase

Tem sido mostrado que o estresse salino promove diferentes respostas na atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática (ASHRAF & HARRIS, 2004). As respostas descritas são conflitantes, mostrando que a salinidade pode estimular, inibir ou não alterar as atividades dessa enzima, sendo isto interpretado de forma distinta em relação ao seu papel na tolerância ao estresse salino. Alguns autores explicam que esses resultados contraditórios se devem às possíveis diferenças nas condições experimentais em que as preparações de membrana são obtidas. Além disso, elas também podem ser devidas às diferentes intensidades ou duração dos estresses salinos aplicados, bem como às variações genéticas e os estádios de desenvolvimento das plantas utilizadas nos experimentos (MANSOUR *et al.*, 2003; PARIDA & DAS, 2005).

Em ambientes salinos, a absorção rápida de Na^+ altera o potencial de membrana, tornando-o menos negativo e, desse modo, alterando a função do transporte. Muitos autores têm considerado que o restabelecimento dos valores normais do potencial de membrana celular é uma condição necessária para os organismos adaptarem-se à salinidade e restabelecer o equilíbrio iônico em ambientes salinos (BINZEL *et al.*, 1988; NIU *et al.*, 1995). Esse argumento se sustenta nos resultados obtidos em halófitas e glicófitas, onde se tem estabelecido uma correlação direta entre a tolerância ao estresse salino, medida em função do crescimento e da regulação das concentrações iônicas, e o aumento nas atividades de hidrólise e de transporte de H^+ da H^+ -ATPase (BRAUN *et al.* 1986; WU & SELISKAR, 1998; YANG *et al.*, 2004). De acordo com Hasegawa *et al.* (2000), a exclusão dos íons Na^+ e Cl^- para o apoplasto é um processo ativo. Em síntese, sabe-se que o sistema de transporte que controla a

exclusão do Na^+ , o antiporte Na^+/H^+ , depende da formação de um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática. Portanto, para extrusão de H^+ há necessidade de um aumento na atividade da H^+ -ATPase de modo a impulsionar o antiporte Na^+/H^+ e regular a homeostase do Na^+ em ambientes salinos.

Alguns autores, por outro lado, têm sugerido que a despolarização da membrana, devido a uma reduzida atividade do transporte de prótons, sob condições de estresse salino, é uma resposta fisiológica capaz de conferir tolerância ao Na^+ , como foi mostrado no estudo da H^+ -ATPase de raízes de plantas de tomate (SUHAYDA *et al.*, 1990). O fluxo dos íons sódio para o interior da célula é um processo passivo favorecido pelas diferenças de concentração e de voltagem (TESTER & DAVENPORT, 2003). Portanto, um potencial de membrana menos negativo, representa uma barreira termodinâmica para controlar a absorção dos íons Na^+ . De acordo com Suhayda *et al.* (1990), um potencial de membrana com essas características favoreceria a atração de ânions, incrementando a probabilidade dos mesmos serem transportados para o citoplasma e, desse modo, utilizados no ajustamento osmótico e na compensação de cargas. Serrano *et al.* (1999), estudando células de levedura, propuseram que esse mecanismo de tolerância baseado na redução da atividade da H^+ -ATPase poderia comprometer outros processos fisiológicos que dependem da atividade dessa enzima, tais como a regulação do pH intracelular e o transporte ativo de nutrientes. Essa regulação negativa pode conferir tolerância temporal ao estresse salino, agindo como um mecanismo de escape.

Segundo Mansour *et al.* (2003), quando as concentrações de Na^+ no interior celular aumentam, sem um correspondente aumento na atividade da H^+ -ATPase, o mecanismo de exclusão de Na^+ é inoperante. Nesse caso, quando a H^+ -ATPase de membrana plasmática não é estimulada pela salinidade, as plantas ativam o sistema de transporte primário do vacúolo (H^+ -ATPase e pirofosfatase), a fim de prover a força próton-motora necessária para o

acúmulo de Na^+ no vacúolo. Provavelmente, esse mecanismo ocorre apenas em plantas tolerantes à salinidade e parece estar ausente nas plantas sensíveis.

2.2. Aclimação e adaptação das plantas ao estresse salino

Plantas tolerantes à salinidade são capazes de manter seu crescimento e completar seu ciclo de vida em ambientes salinos (PARIDA & DAS, 2005). Para isso, as plantas utilizam mecanismos de homeostase hídrica (ajustamento osmótico) ou iônica (exclusão e compartimentalização de íons), os quais minoram ou evitam os efeitos deletérios do estresse, permitindo assim, a sobrevivência em ambientes salinizados (BRAY *et al.*, 2000; YOKOI *et al.* 2002).

Alternativamente ao emprego de caracteres agronômicos utilizados nos programas de seleção de cultivares tolerantes à salinidade, tem sido proposto o uso de parâmetros fisiológicos e bioquímicos que agem a nível celular e da planta inteira, tais como a fotossíntese, as trocas gasosas, a regulação da concentração de íons e o estado hídrico da planta (ASHARAF & HARRIS, 2004). Nestes processos estão envolvidas diferentes moléculas que mediam a homeostase iônica e hídrica e a transdução de sinais que regulam as respostas de longa distância (HASEGAWA, *et al.*, 2000). Embora nenhum desses parâmetros tenha sido, inequivocamente, correlacionado com a tolerância à salinidade, considera-se que as mudanças na composição de metabólitos e de íons presentes em folhas e raízes a fim de restabelecer a homeostase hídrica e iônica são, provavelmente, as características mais comuns e universais da tolerância ao estresse salino. De acordo com Zhu (2001), as plantas devem desenvolver mecanismos para prevenir e remediar o dano provocado pelo excesso de sais, restabelecendo as condições homeostáticas para se adaptarem ao novo ambiente, retomando o crescimento, ainda que a taxas reduzidas.

Cheeseman (1988) sugere que a quantidade de íons que atinge as folhas deve ser limitada para não ultrapassar a capacidade de compartimentalização dos mesmos no vacúolo. Tendo em consideração isto, o mecanismo que possibilitaria às plantas tolerar altos níveis de salinidade envolveria um controle mais eficiente no transporte de íons tóxicos para os órgãos aéreos transpirantes, acumulando-os nas raízes (MUNNS, 2002). 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; PARANYCHIANAKIS & CHARTZOULAKIS, 2005). Estudos recentes, no entanto, questionam a contribuição desse mecanismo para conferir tolerância à salinidade. Garcia-Sanchez *et al.* (2002) e Chartzoulakis *et al.* (2002) concordam que a compartimentalização de sais nas raízes pode prevenir os efeitos do estresse salino apenas a níveis baixos de salinidade ou a exposição de curto tempo aos sais.

Em muitas árvores frutíferas, a influência negativa dos sais deve-se, principalmente, ao acúmulo do íon cloreto nas folhas. Portanto, genótipos com tolerância à salinidade deveriam controlar o transporte desse íon para as folhas, acumulando-os nas raízes (PARANYCHIANAKIS & CHARTZOULAKIS, 2005). No caso das gramíneas, o controle do transporte de Na^+ para a parte aérea é fundamental (TESTER & DAVENPORT, 2003). Glicófitas perenes, cujas folhas permanecem por um período de tempo maior do que o de plantas anuais, devem possuir também uma maior capacidade para controlar a absorção de íons tóxicos como ocorre nas halófitas. Tester & Davenport (2003) indicaram que esse mecanismo é controlado pelas células do parênquima do xilema radicular com propriedades de transporte diferentes.

2.3. O cajueiro

2.3.1. Origem e aspectos botânicos

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma árvore frutífera originária do Brasil, pertencente à família *Anacardiaceae*. Esta família é composta por árvores e arbustos de regiões tropicais e subtropicais que apresentam ramos sempre providos de canais resiníferos com folhas alternadas, coriáceas e sem estípulas (LIMA, 1988). Dentro da família *Anacardiaceae* estão incluídos mais de 60 gêneros e 400 espécies (BAILEY, 1964), algumas delas importantes do ponto de vista econômico por serem produtoras de frutos, madeira de lei e tanino (LIMA, 1988; FERRÃO, 1995). As primeiras classificações baseadas nos critérios da taxonomia clássica catalogaram 20 espécies dentro do gênero *Anacardium*, entretanto, Mitchell e Mori (1987), utilizando a taxonomia numérica, reduziram a dez esse número de espécies, todas de ocorrência no Brasil, reforçando a hipótese sobre a origem brasileira do cajueiro.

A. occidentale L. é a espécie de maior dispersão no mundo, distribuindo-se em diferentes ecossistemas, especialmente nas zonas costeiras, compondo a vegetação de praias, dunas e restingas (CRISÓSTOMO *et al.*, 2001). O cajueiro é a única espécie desse gênero que é domesticada e cultivada em escala comercial (LIMA, 1988).

A árvore de cajueiro pode ter uma altura de 10 a 15 m e copa muito desenvolvida; o caule, em geral, é curto, grosso, tortuoso e ramificado logo acima do nível do terreno (FERRÃO, 1995). As flores são pequenas; pálidas, avermelhadas ou púrpuras, com corola e cálice normalmente pentâmeros, dispostas em amplas panículas terminais, com flores masculinas (estaminadas) e hermafroditas (LIMA, 1988; FERRÃO, 1995). O fruto do cajueiro é a castanha, um aquênio reniforme pendente do pedúnculo floral hipertrofiado

(pseudofruto), o qual se mostra carnosos e suculento, geralmente de excelente qualidade gustativa e alto valor nutritivo. A castanha compõe-se de pericarpo (casca) e da amêndoa, de formato rinóide, constituída do tegumento e do embrião, o qual possui dois cotilédones brancos, carnosos e oleosos, sendo de alto valor energético (LIMA, 1988).

A maior biodiversidade do cajueiro encontra-se no Nordeste Brasileiro e parte desta diversidade está sendo conservada na coleção de germoplasma da EMBRAPA Agroindústria Tropical, no campo experimental de Pacajús, no Estado do Ceará. Dentre as variedades existentes, o tipo comum, também conhecido como gigante, por seu alto porte e expansão de copa que pode atingir os 20 m, é o mais difundido (CRISÓSTOMO *et al.*, 2001). O tipo anão, caracterizado pelo porte baixo, apresenta precocidade etária e elevada produtividade, iniciando o florescimento entre 6 a 18 meses. Botanicamente, ainda não possui uma classificação definida, pois tanto é citado como *Anacardium occidentale* var. *nanum* (BRAGA, 1976), como *Anacardium nanum* (PEIXOTO, 1960), ou simplesmente como um ecotipo ou forma botânica do cajueiro tipo comum (BARROS *et al.*, 1993). Algumas características morfológicas como a cor, o formato e a consistência do pedúnculo, dentre outras, têm sido utilizadas para caracterizar varietalmente o cajueiro (FERRÃO, 1995). Porém, o elevado grau de polinização cruzada existente nessa espécie, dificulta a manutenção das características das variedades que conduz à geração de indivíduos com alto grau de heterozigose (LIMA, 1988).

2.3.2. Importância econômica

No Nordeste, a agroindústria do caju é uma das principais atividades econômicas, participando decisivamente na geração de emprego e renda e respondendo por centenas de milhares de postos de trabalho em toda a região. Segundo dados do Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatística – IBGE, durante o período 2000-2004, a produção (em toneladas) de castanha de caju na região Nordeste do Brasil, mostrou um aumento de 43%, sendo o Estado do Ceará responsável por mais de 60% da produção nos anos de 2002 e 2003. Com base também nos últimos dados do IBGE, o Estado do Ceará possui a maior área de cajueirais com aproximadamente 366,1 mil hectares que representam 53,9% da área total da região Nordeste dedicada à cultura do cajueiro. No entanto, no ano 2004, o IBGE registrou uma queda de 25% na produção de castanha de caju no Estado do Ceará. Nesse ano, o Estado do Ceará contribuiu com 46% da produção de castanha na região Nordeste.

2.3.3. Relevância dos porta-enxertos

Com a expansão da cajucultura para outras regiões do Brasil, há uma necessidade urgente na obtenção de mudas, as quais podem ser obtidas tanto a partir de sementes (propagação sexuada), como através de mudas enxertadas (propagação assexuada). Em relação a este último sistema de propagação, o papel do porta-enxerto é de vital importância tanto pela sua influência direta na formação de pomares, como pelo efeito que possa resultar do seu uso, em diferentes ambientes de cultivo (CAVALCANTE JUNIOR *et al.*, 2003). A importância do enxerto e porta-enxerto no crescimento e produção tem promovido numerosas investigações em outras árvores frutíferas (*Citrus*, *Vitis*, *Oliva*), a fim de selecionar pomares uniformes e capazes de incrementar seus níveis de tolerância a diferentes tipos de estresse, incluindo o estresse salino (RIVERO *et al.*, 2003). Apesar da cajucultura ser praticada intensivamente em áreas sujeitas a condições de salinização, déficit hídrico e alcalinização dos solos, são escassos os trabalhos sobre os efeitos desses fatores, na produtividade desta cultura. A produção comercial de mudas de cajueiro é obtida, quase que exclusivamente, usando-se o clone CCP 06 como porta-enxerto (SILVA, 2004), para o qual há carência de estudos sobre seu comportamento em diferentes ambientes, especialmente sob condições de

estresse hídrico e salino. Portanto, é de vital importância para a sustentação da cajucultura o desenvolvimento de novos materiais (enxerto e porta-enxertos) de cajueiro anão-precoce que sejam capazes de crescer e produzir economicamente em ambientes salinos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Experimento I: Respostas dos clones de cajueiro anão-precoce ao estresse salino

Este experimento teve por finalidade selecionar, dentre cinco clones de cajueiro anão-precoce, dois com tolerância diferenciada ao estresse salino, analisando-se o crescimento, as trocas gasosas, as relações hídricas e o acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos.

3.1.1. Semeadura, condições de cultivo e coleta das plantas

No experimento, foram utilizadas castanhas (sementes) dos clones CCP 06, CCP 09, CCP 76, BRS 189 e Embrapa 51 (E 51) de cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.), fornecidas pela EMBRAPA-Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará. As castanhas foram devidamente tratadas com o fungicida metiltiofan (SIPCAM Agro S.A., São Paulo) a 0,1%, sendo em seguida semeadas em potes de plásticos de 5,5 L contendo vermiculita umedecida com água destilada (controle) ou com soluções de NaCl, cujas condutividades elétricas (C.E.) eram 8 e 16 dS.m⁻¹ (tratamentos salinos). A relação vermiculita/água ou solução salina foi de 2:1 (v/v). As castanhas, em número de nove, foram semeadas a uma profundidade de 3 cm, em posição vertical e com o ponto de inserção do pedúnculo na castanha voltado para acima. Os potes, contendo as castanhas semeadas, foram pesados e mantidos em condições de casa de vegetação. Para repor a água perdida por evapotranspiração foram feitas adições diárias de água destilada aos potes, de modo a manter o peso aferido inicialmente. Durante o período experimental, as medidas de temperatura e de umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação foram registradas com um termohigrógrafo, sendo observados os valores médios de 28,4 ± 0,9°C e 73,9 ± 5,8%, respectivamente. Aos 28 dias após a semeadura, as plântulas foram coletadas e divididas em: raízes, caules + pecíolos, folhas e cotilédones. A Figura 1

mostra a foto das plântulas de cajueiro anão-precoce do Experimento I, em casa de vegetação, no dia da coleta.

3.1.2. Medidas de crescimento

Por ocasião da coleta, foram determinadas a área foliar (AF) utilizando-se um medidor de área (LI-3100, Li-Cor, Inc. Lincoln, NE, USA), e os pesos das matérias frescas (MF) das diversas partes coletadas das plântulas. A determinação da matéria seca (MS) foi feita pela pesagem do material após três dias de secagem em estufa a 60°C. Com essas medidas, foram estimados os valores das relações: matéria fresca da parte aérea/matéria fresca das raízes (MFPA/MFR) e matéria seca da parte aérea/matéria seca das raízes (MSPA/MSR).

3.1.3. Potencial osmótico, teor de água e suculência foliar

O potencial osmótico (Ψ_s) foi determinado nas quatro primeiras folhas completamente expandidas e no terço externo final das raízes, sendo as determinações feitas com quatro repetições, cada uma constituída por duas plântulas. Para isso, durante a coleta, o material para medição do Ψ_s foi congelado e armazenado a -25°C até sua posterior utilização. Os sucos extraídos, após descongelamento das folhas e raízes, foram empregados nas determinações de Ψ_s e foram obtidos macerando-se, à temperatura ambiente, o material vegetal em almofariz, seguido de prensagem do macerado (envolto numa tela de náilon) com o êmbolo de uma seringa descartável de 10 mL. O líquido obtido foi centrifugado a



Figura 1. Plântulas de cajueiro anão-precoce dos clones CCP 06, CCP 09, CCP 76, E 51 e BRS 189 aos 28 dias após a semeadura em casa de vegetação (Experimento I).

3.000 x g por 10 min, sendo o sobrenadante utilizado para a determinação do Ψ_s , em um microosmômetro de pressão de vapor (VAPRO 5520, Wescor, Logan Utah, USA), utilizando-se uma alíquota de 10 μ L. Os valores de Ψ_s foram expressos em MPa.

Os teores de água (TA) foram determinados nas folhas e raízes, empregando-se a fórmula: $TA = [(MF - MS)/MS] \times 100$, conforme Barrs (1968), sendo expressos em percentagens.

A suculência foliar (SF) foi determinada segundo Benincasa (1988), empregando-se a fórmula: $SF = (MF_{folha} - MS_{folha})/AF$, sendo expressa em $mg\ H_2O.cm^{-2}$.

3.1.4. Trocas gasosas

As medidas de fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática foram realizadas aos 27 dias após a semeadura, entre 10:00 e 12:00 h, e em condições de temperatura, radiação e umidade do ar ambientais. As medições foram feitas nas primeiras folhas totalmente expandidas das mesmas plântulas utilizadas para a determinação de Ψ_s , sendo empregado o analisador de gás no infravermelho (IRGA, mod. LCA-2, ADC, Hoddesdon, UK), em sistema aberto, com fluxo de ar de 200 $mL.min^{-1}$.

3.1.5. Teores de íons

Os teores dos íons sódio, potássio e cloreto foram determinados nas diferentes partes coletadas das plantas. Os extratos foram preparados a partir da homogeneização de 100 mg do material seco em estufa, finamente triturado, com 10 mL de água desionizada, durante 20 min, sob agitação constante. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3.000 x g por 10 min, sendo o sobrenadante coletado e filtrado em papel de filtro (extrato). Os teores de sódio e

potássio no extrato foram determinados por fotometria de chama, segundo Malavolta *et al.* (1989) e os de cloreto segundo o método de Gaines *et al.* (1984). Para isso, a 3 mL do extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL do reagente formado por $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ a 13,2 mM, em metanol, e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ a 20,2%, na proporção de 4:1. Após forte agitação e repouso por 15 min, foram feitas leituras de absorvância em 460 nm, utilizando-se NaCl como padrão. Cada repetição para a determinação dos íons sódio e potássio constou de uma única leitura do extrato no fotômetro de chama, enquanto que para o cloreto cada repetição constou da dosagem do extrato em duplicata. Os teores dos íons foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS.

3.1.6. Determinação dos solutos orgânicos

Os solutos orgânicos (prolina, N-aminossolúveis e carboidratos solúveis) foram determinados nos mesmos extratos radiculares que foram utilizados nas determinações de Ψ_s , conforme descrito no item 3.1.3.

3.1.6.1. Concentração de prolina livre

A concentração de prolina livre foi determinada de acordo com Bates *et al.* (1973). Em uma alíquota de 1,0 mL do suco radicular, convenientemente diluído, foram adicionados 1,0 mL do reagente da ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina, dissolvida em 30 mL de ácido acético glacial, e 20 mL de ácido fosfórico a 6 M) e 1,0 mL de ácido acético glacial. Os tubos de ensaio foram hermeticamente fechados e, após homogeneização da mistura de reação, deixados 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. A concentração de prolina foi estimada com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de prolina.

3.1.6.2. Concentração de N-aminossolúveis

Os N-aminossolúveis foram determinados de acordo com o método de Yemm & Cocking (1955). Em tubos de ensaios, foram adicionados 0,5 mL do suco radicular, convenientemente diluído, 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 ninhidrina a 5%, em metilcelosolve a 100%. Em seguida, os tubos foram fechados, agitados vigorosamente e colocados em banho-maria a 100°C por 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%. A concentração de N-aminossolúveis foi estimada através de leituras de absorvância em 570 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de glicina.

3.1.6.3. Concentração de carboidratos solúveis

Os carboidratos solúveis foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). Em uma alíquota de 0,5 mL do suco radicular, convenientemente diluído, 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 para 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.

A concentração dos solutos orgânicos foi expressa em milimolar (mM) e cada repetição foi representada por uma amostra (extrato) dosada em duplicata.

3.1.7. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento do Experimento I foi o inteiramente casualizado, obedecendo a um arranjo fatorial (5 x 3), correspondendo a cinco clones, dois tratamentos salinos a 8 e 16 dS.m⁻¹ de condutividade elétrica (C.E.), e um tratamento controle com água destilada. O experimento foi conduzido com quatro repetições e cada repetição constituiu-se de nove plântulas, perfazendo um total de sessenta potes e 540 plântulas. Os resultados foram analisados com base nas médias ± o desvio padrão.

3.2. Experimento II: Efeitos da salinidade na atividade ATPásica e nos lipídios de membrana plasmática de dois genótipos de cajueiro anão-precoce

Neste experimento foram utilizados dois clones de cajueiro anão-precoce contrastantes com relação a sua resposta à salinidade: CCP 06, sensível e BRS 189, tolerante. Utilizando-se vesículas enriquecidas com membranas plasmáticas, isoladas de raízes de plântulas desses dois clones, foram estudados os efeitos do estresse salino na atividade da H⁺-ATPase e na composição e peroxidação dos lipídios.

3.2.1. Isolamento de membrana plasmática

O isolamento das vesículas de membrana plasmática foi realizado a partir de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce com 28 dias após a semeadura, sob condições controle e de estresse salino (NaCl a 8 dS.m⁻¹ de C.E.). Logo após a coleta das plântulas, as raízes foram

separadas e imediatamente lavadas com água destilada a 4°C. Em seguida, procedeu-se à retirada das raízes laterais, as quais foram maceradas utilizando-se almofariz e pistilo em meio de homogeneização contendo sacarose a 250 mM, EGTA a 2 mM, MgSO₄ a 2 mM, ATP a 2 mM, glicerol a 10%, PMSF a 1 mM, DTT a 2 mM, BSA a 0,5%, PVP-40 a 3%, KI a 250 mM, Tris-HCl, pH 8,0 a 75 mM. Foram utilizadas raízes laterais de 10 plântulas para cada 20 mL de meio de homogeneização. O homogenato foi filtrado em tela de náilon, sendo, em seguida centrifugado a 10.000g, durante 15 min, a 4°C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante submetido a uma centrifugação a 32.000g, por 45 min, a 4°C. O precipitado, fração microssomal, foi ressuspensão num meio contendo sacarose a 250 mM, glicerol a 10%, DTT a 1 mM, BSA a 0,2%, KCl a 50 mM, Brij 58 a 0,05%, Tris-Mes, pH 7,5 a 10 mM. Em seguida, essa fração foi sobreposta a um gradiente descontínuo, contendo soluções de sacarose a 42% e a 33%, preparadas em um meio composto por EDTA a 1 mM, EGTA a 1 mM, DTT a 2 mM, PMSF a 1 mM, KCl a 10 mM, Tris-Mes, pH 7,5 a 10 mM, sendo submetida à ultracentrifugação a 80.000g durante 2 h. Ao final desse tempo, foi coletada a banda formada na interface das duas soluções de sacarose. Em seguida, a banda coletada foi diluída em uma solução de DTT a 1 mM, EDTA a 1 mM, EGTA a 1 mM, PMSF a 1 mM, KCl a 50 mM, Tris-Mes pH 7,5 a 10 mM, sendo concentrada por ultracentrifugação a 80.000 x g, durante 1 h. O precipitado formado (vesículas membranares) foi ressuspensão numa solução contendo sacarose a 250 mM, glicerol a 10%, DTT a 1 mM, KCl a 50 mM, Tris-Mes pH 7,5 a 10 mM, sendo conservado em nitrogênio líquido até sua utilização nos ensaios de atividade enzimática. Devido às interferências por açúcares na determinação de malondialdeído (HODGES *et al.*, 1999), para a estimativa da peroxidação de lipídios, a sacarose foi omitida da solução de ressuspensão das membranas. As preparações de vesículas de membrana plasmática foram armazenadas em nitrogênio líquido, até sua utilização nos ensaios de atividade enzimática, ou no freezer a -20°C para as demais análises bioquímicas.

3.2.2. Atividade H⁺-ATPásica de membrana plasmática

A atividade de hidrólise enzimática do ATP pelas membranas plasmáticas, oriundas de plântulas cultivadas sob condições controle e de estresse salino, foi avaliada pela liberação de fosfato inorgânico (Pi) segundo método proposto por Fiske & Subbarow (1925), com as modificações propostas por Yan *et al.* (1998). Para isso, 1 a 3 µg de proteína de membrana foram pré-incubadas, durante 5 min a 30°C, em um meio contendo MgSO₄ a 5 mM, KCl a 50 mM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ a 0,1 mM, Brij 58 a 0,05% (p/v), Mes-Tris (pH 6,5) a 30 mM. O volume final da reação foi de 0,5 mL. A reação enzimática foi iniciada pela adição de ATP a uma concentração final de 5 mM e procedeu durante 30 min a 30°C. A reação enzimática foi parada pela adição, em cada tubo, de 1 mL da solução de Fiske (SDS a 0,5% w/v, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4 H₂O a 0,52% w/v, H₂SO₄ a 2,4% v/v), seguido da adição imediata de 50 µL de ácido ascórbico a 10%, sendo os tubos mantidos à temperatura ambiente durante 10 min. Transcorrido esse tempo, foram adicionados 1,45 mL da solução arsenito-citrato (citrato de sódio a 2% w/v, arsenito de sódio a 2% w/v, ácido acético glacial a 2% w/v), sendo os tubos incubados à temperatura ambiente durante 30 min. As leituras para a determinação de fosfato inorgânico livre foram realizadas a 820 nm. De posse das leituras espectrofotométricas, o fosfato inorgânico produzido foi expresso em µmol, calculado a partir de uma curva de calibração utilizando-se como padrão o ácido fosfórico.

Tendo em vista uma possível contaminação da preparação acima por fosfatases ácidas ou vesículas de membrana mitocondrial e para se ter a atividade de hidrólise do ATP somente devida à H⁺-ATPase de membrana plasmática, foram utilizados nos ensaios inibidores específicos dessas enzimas. Para excluir a possibilidade da hidrólise do ATP ser devida à presença de fosfatases ácidas nas preparações de membrana, os ensaios foram feitos em presença de molibdato a 1,0 mM (YAN *et al.*, 1998). A azida sódica a 1,0 mM foi empregada como inibidor da H⁺-ATPase mitocondrial e ortovanadato de sódio a 0,1 mM como inibidor

da H⁺-ATPase de membrana plasmática, segundo proposto por Yan *et al.* (1998). Todos os ensaios de atividade ATPásica foram feitos em presença de molibdato e azida sódica, bem como em presença desses dois inibidores mais ortovanadato. A atividade da H⁺-ATPase foi estimada pela diferença entre os dois valores de atividades obtidos, sendo a atividade específica expressa em $\mu\text{mol Pi.mg}^{-1} \text{ Prot.min}^{-1}$. Nos ensaios de atividade enzimática, cada repetição constou da dosagem em duplicata de cada preparação membranar.

3.2.3. Peroxidação dos lipídios de membrana

A peroxidação dos lipídios de membrana plasmática foi determinada de acordo com o método proposto por Buege & Aust (1978). Para isto, preparações enriquecidas de membrana contendo 20 μg de proteínas de membrana foram ressuspensas em um volume final de 100 μL de uma solução contendo glicerol a 10%, DTT a 1 mM, KCl a 50 mM, Tris-Mes (pH 7,5) a 10 mM, seguido da adição de 1 mL de uma solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5% e ácido tricloroacético (TCA) a 20%. A mistura foi incubada em banho-maria fervente durante 30 min e, em seguida, os tubos de reação foram colocados em banho de gelo por 5 min e centrifugados a 3.000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi coletado com uma pipeta Pasteur, sendo sua absorvância determinada a 535 nm. A concentração de malondialdeído (MDA) das amostras foi calculada usando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e expressa em $\mu\text{mol de MDA.mg}^{-1} \text{ Prot}$. Cada repetição constou da dosagem em triplicata de cada preparação membranar.

3.2.4. Análise dos lipídios de membrana

3.2.4.1. Extração dos lipídios de membrana

Os lipídios totais das preparações enriquecidas de membrana plasmática foram extraídos de acordo com o método de Bligh & Dyer (1959). Para isto, preparações de membranas contendo 100 a 200 μg de proteínas foram incubadas com 500 μL de isopropanol em banho-maria fervente, durante 1 min, a fim de inibir as lipases endógenas. Em seguida, foram adicionados 2 mL da mistura metanol/clorofórmio (1:1 v/v) e 1 mL de NaCl a 0,88%, sendo a suspensão obtida agitada em vórtex e a extração realizada durante 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 min e deixadas em repouso. A fase inferior (clorofórmica) contendo o material lipossolúvel foi coletada com uma pipeta Pasteur. Uma segunda extração foi feita, desta vez com 1 mL de clorofórmio, em procedimento idêntico ao descrito anteriormente. Essa última fração lipídica obtida foi transferida para os mesmo tubos que armazenavam os lipídios da primeira extração. O clorofórmio da fração lipídica foi evaporado com nitrogênio gasoso e o material obtido foi ressuspense em um volume de 400 μL de clorofórmio e armazenado a -20°C até sua utilização nas cromatografias de camada delgada.

3.2.4.2. Cromatografia de camada delgada

Os fosfolipídios totais das frações enriquecidas de membranas plasmáticas foram separados e identificados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de Sílica Gel 60 (Merck, Darmstadt) de dimensões de 20 cm x 20 cm x 0,25 mm. Antes das cromatografias, as placas foram deixadas em estufa a 50°C durante uma noite para ativação. Para separação cromatográfica das diferentes subclasses de fosfolipídios, utilizou-se como

eluente o solvente formado pela mistura de clorofórmio, acetona, metanol, ácido acético e água destilada, na proporção de 50:20:10:10:5 (v/v), respectivamente, segundo Lepage (1967). Vinte e quatro horas antes da cromatografia, o solvente de eluição (95 mL) foi colocado em uma cuba de vidro (25,5 cm x 25,5 cm x 7,5 cm) hermeticamente fechada, para saturação da atmosfera.

Nas cromatografias foram utilizadas amostras combinadas das frações membranares obtidas das três repetições (nove plantas por cada repetição) em que o Experimento II foi conduzido. Essas amostras (aprox. 200 µL) foram aplicadas sobre uma linha desenhada a um centímetro da extremidade inferior da placa. Após a migração da amostra, a placa foi retirada da cuba, secada em capela até completa evaporação do solvente e revelada com primulina para visualização dos lipídios no escuro, sob luz ultravioleta (UV). A identificação dos fosfolipídios foi feita por comparação com padrões apropriados aplicados na placa durante a cromatografia. Uma vez identificado cada fosfolipídio, as bandas foram circuladas cuidadosamente com lápis e, então, a placa foi desenhada. Em seguida, em cada banda correspondente a um fosfolipídio, a sílica gel foi raspada e depositada em um tubo de ensaio para extração e posterior determinação quantitativa do fosfolipídio. A extração foi feita de forma idêntica ao descrito no item 3.2.4.1, sendo as amostras dos fosfolipídios, no final, obtidas após evaporação do clorofórmio com nitrogênio gasoso.

3.2.4.3. Quantificação dos fosfolipídios

Para quantificação dos fosfolipídios obtidos por CCD, as amostras foram primeiramente submetidas a uma digestão com ácido perclórico, segundo o método de Dittmer & Wells (1969). Cada amostra foi tratada com 0,8 mL de ácido perclórico a 71% e deixada em um digestor. A temperatura do digestor foi elevada gradualmente até 200°C e

permaneceu nessa temperatura até a solução tornar-se transparente, sendo o tempo total no digestor de aproximadamente 90 min. A quantificação dos fosfolipídios foi realizada através da dosagem do fósforo liberado na forma inorgânica segundo o método de Fiske & Subarrow (1925). O teor de cada fosfolipídio foi expresso em $\mu\text{g. } \mu\text{g}^{-1}$ Prot., usando-se como padrão a fosfatidiletanolamina (PE). Os resultados foram expressos em percentagem do total. Cada repetição constou da dosagem em duplicata de cada fosfolipídio retirado da placa de sílica gel.

3.2.4.4. Esteróis totais de membrana

Para a análise dos esteróis totais, foram utilizadas amostras combinadas das frações membranares obtidas das três repetições em que o Experimento II foi conduzido. Os lipídios totais extraídos dessas amostras foram primeiramente separados por CCD, em procedimento idêntico ao descrito anteriormente, exceto com relação ao solvente, o qual tinha a seguinte composição: hexano, éter etílico e ácido acético, na proporção de 80:20:1,5 (v/v), respectivamente, segundo Zwiazek & Blake (1990). Para a revelação da placa, foi empregada uma solução de primulina, sendo esta aplicada apenas no padrão de colesterol, o qual correu junto com as amostras e foi visualizado no escuro, sob lâmpada UV. As amostras a serem identificadas não foram borrifadas com esta solução devido ao fato da primulina interferir com o método de quantificação dos esteróis. A região na placa correspondente aos esteróis totais presentes nas frações de lipídios de membrana plasmática foi determinada levando-se em conta a distância de migração do padrão e a faixa de aplicação da amostra. Em seguida, essa região foi cuidadosamente circulada com lápis e a sílica raspada e depositada em tubos de ensaio para posterior quantificação.

A quantificação dos esteróis na sílica foi realizada segundo o método descrito por Skipski & Barclay (1969). Em cada amostra foram adicionados 1,5 mL da solução gel de

$K_2Cr_2O_7$ a 0,2% dissolvida em H_2SO_4 concentrado, sendo os tubos agitados até a sílica formar uma suspensão fina. Em seguida, os tubos foram aquecidos em banho-maria fervente por 45 min. Após este tempo, os tubos foram esfriados em banho de gelo e em seguida, centrifugados a 3.000g por 15 min. No sobrenadante, convenientemente diluído, foram feitas as leituras de absorvância a 350 nm, sendo a concentração total dos esteróis calculada a partir de uma curva padrão com concentrações crescentes de colesterol. Uma área de sílica (*spot*) equivalente àquela, na qual não foram aplicadas as amostras lipídicas, foi também raspada e utilizada como branco. Os teores de esteróis totais foram expressos em $\mu g \cdot \mu g^{-1}$ Prot. Cada repetição constou da dosagem em duplicata dos esteróis presentes no *spot* retirado da placa de sílica.

3.2.5. Determinação de proteína na fração membranas

A determinação de proteína foi realizada através do método proposto por Bradford (1976). Para isso, a 0,1 mL da fração membranas, convenientemente diluída, adicionou-se 1,0 mL do reagente do *coomassie*, o qual foi preparado dissolvendo-se 100 mg de *coomassie brilliant blue* G-250 (Sigma Chemical Company) em 50 mL de álcool etílico a 95%, seguindo-se da adição de 100 mL de ácido fosfórico a 85%, sendo o volume final completado para 1000 mL com água destilada. Após 10 min da adição desse reagente à amostra foram efetuadas as leituras de absorvância a 595 nm, usando-se como branco a mistura de 0,1 mL do meio de ressuspensão das membranas com 1 mL do reagente do *coomassie*. Como padrão foi utilizada a albumina de soro bovino. Cada repetição correspondeu à dosagem em triplicata de cada preparação de fração membranas.

3.2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento do Experimento II foi o inteiramente casualizado, obedecendo a um arranjo fatorial (2 x 2), correspondendo a dois clones, um tratamento salino (NaCl a 8 dS.m⁻¹ de C.E.) e um tratamento controle com água destilada (0 dS.m⁻¹). Cada tratamento foi realizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por dois potes contendo cada um nove plântulas, perfazendo um total de 24 potes e 216 plântulas. Para a análise da atividade da H⁺-ATPase e peroxidação de lipídios de membrana plasmática foram realizados 10 experimentos, e os resultados foram expressados com base nas médias ± o desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de crescimento

4.1.1. Crescimento foliar

As medidas de matéria fresca (MFF), matéria seca (MSF) e área (AF) foliares dos cinco clones de cajueiro anão-precoce são mostradas na Figura 2. Na dose de NaCl correspondente a uma condutividade elétrica (C.E.) de 8 dS.m^{-1} , os clones CCP 06, CCP 76 e Embrapa 51 (E 51) tiveram maiores reduções nesses parâmetros que os clones CCP 09 e BRS 189. O CCP 06 foi o clone mais afetado, com reduções de 22,7, 25,6 e 32,0% nas medidas de AF, MFF e MSF, respectivamente, em relação às plantas controles. Por outro lado, nessa mesma dose de sal (8 dS.m^{-1}), o clone BRS 189 foi o que apresentou menores reduções nos valores de AF (16,8%), MFF (19,0%) e MSF (20,0%), juntamente com o clone CCP 09 que apresentou uma redução percentual média de 19% nos parâmetros de crescimento avaliados. Quando as plantas foram submetidas a uma C.E. de 16 dS.m^{-1} , os clones CCP 06 e CCP 76 foram os que apresentaram maiores reduções, sendo o clone CCP 06 o mais afetado, com reduções na AF, MFF e MSF de 47,1, 49,3 e 55,0%, respectivamente, em relação às plantas controle (Figura 2). Os clones CCP 09, E 51 e BRS 189 tiveram também reduções significativas nos parâmetros de crescimento foliar, com valores compreendidos entre 40 e 45%, quando comparados ao 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. Esses autores observaram que o clone E 51 foi o que apresentou maior redução nesse parâmetro, embora deva ser ressaltado que as condições experimentais foram

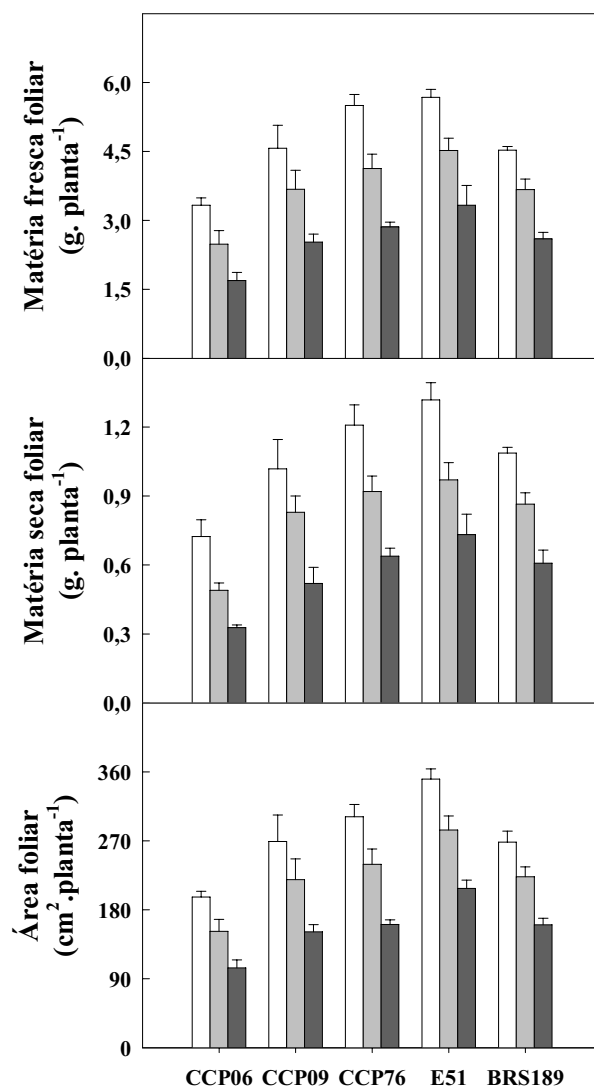


Figura 2. Matéria fresca, matéria seca e área foliares de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (■) e 16 (■) dS.m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

diferentes das utilizadas aqui. Muitas outras plantas lenhosas frutíferas mostraram reduções no crescimento foliar quando submetidas a estresse salino (CHARTZOULAKIS *et al.*, 2002; GEBAUER *et al.*, 2004). O declínio na área foliar é uma das respostas iniciais das glicófitas quando expostas ao estresse salino (MUNNS & TERMAAT, 1986). Foi observado, em *Raphanus sativus*, que 80% da redução da massa seca da planta era, provavelmente, resultado do efeito negativo da salinidade sobre o crescimento da folha, reduzindo a área superficial disponível para incidência da energia luminosa utilizada no processo de fotossíntese (MARCELIS & Van HOOIJDONK, 1999).

De acordo com Neumann (1997), a redução no crescimento foliar causada pelos estresses hídrico e salino pode representar uma resposta adaptativa das plantas que crescem naturalmente em regiões semi-áridas do globo. Nesse caso, a redução no crescimento foliar limita a taxa do fluxo transpiratório, levando a um uso mais eficiente da pouca quantidade de água disponível no solo, reduzindo a absorção de íons e prolongando a sobrevivência da planta durante os meses secos. Contudo, em culturas crescendo sob condições de irrigação, a pouca produção de tecido foliar novo causa um acúmulo excessivo de íons nas folhas velhas desencadeando os processos de senescência e de necrose foliares, que influenciam e alteram o processo fotossintético, reduzindo a quantidade de fotoassimilados importantes para o crescimento vegetal (MUNNS, 1993).

4.1.2. Crescimentos da parte aérea e das raízes

Os valores das matérias frescas da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR), bem como das matérias secas da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) dos cinco clones de cajueiro anão-precoce são apresentados na Figura 3. Em relação à MFPA, o clone BRS 189 foi o

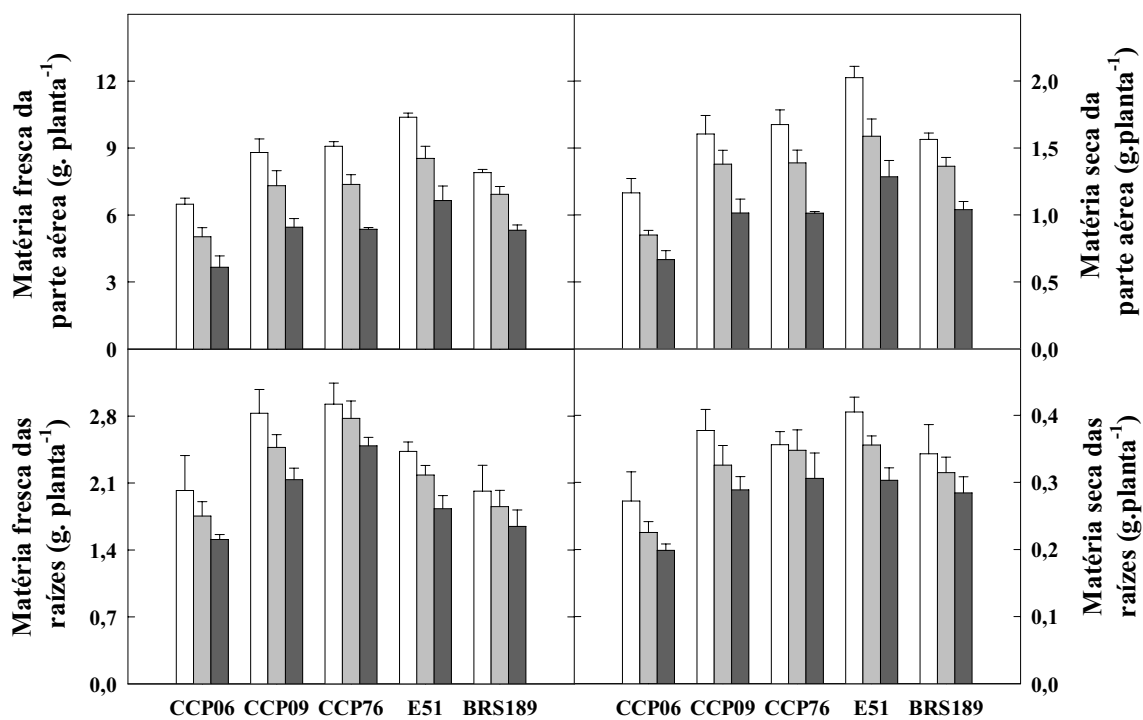


Figura 3. Matérias frescas e secas da parte aérea e das raízes de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (◻) e 16 (◼) dS.m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

menos afetado pela salinidade, com reduções médias, em relação ao controle, de 12,3 e 32,8% nos tratamentos com 8 e 16 dS.m⁻¹ de C.E., respectivamente, enquanto o clone CCP 06 foi o mais afetado, apresentando reduções de 22,5 e 44,0% nos tratamentos de 8 e 16 dS.m⁻¹, respectivamente (Figura 3). Essa mesma tendência foi observada em relação à MSPA, tendo o clone CCP 06 apresentado reduções médias, em relação às plantas controle, de 27,4 e 42,7% nos tratamentos de 8 e 16 dS.m⁻¹, respectivamente, enquanto o clone BRS 189 apresentou, nesses mesmos tratamentos, reduções médias de apenas 12,8 e 33,3%, respectivamente. Embora tenha havido uma tendência de queda, em relação ao controle, as diferenças observadas nos valores de MFR e MSR das plântulas sob salinidade a 8 dS.m⁻¹, não foram significativas (Figura 3). No tratamento a 16 dS.m⁻¹, os clones BRS 189 e CCP 76 não apresentaram diferenças significativas, em relação ao controle, nos valores de MSR. Quando se analisou a MSR, observou-se que os clones CCP 06 e E 51 foram os mais afetados pela salinidade, com reduções de aproximadamente 27% no tratamento a 16 dS.m⁻¹. As maiores reduções na MFR foram observadas nos clones CCP 06, CCP 09 e E 51, com uma redução média de 25%, em relação ao controle (Figura 3).

Outros autores também observaram redução no crescimento de plântulas de cajueiro anão-precoce sob condições de salinidade (VIÉGAS *et al.*, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2002). Essa redução no crescimento vegetativo pela exposição à salinidade é uma característica das glicófitas e halófitas, porém as primeiras são afetadas mesmo a níveis relativamente baixos de salinidade (FLOWERS *et al.*, 1977; GREENWAY & MUNNS, 1980) Os efeitos negativos da salinidade sobre o crescimento das plantas estão associados a sua interferência nos processos de assimilação líquida por unidade de área foliar, de translocação de carboidratos para tecidos drenos e no desvio de fontes de energia para outros processos, tais como: ajustamento osmótico, síntese de solutos compatíveis, reparo de danos causados pela salinidade e

manutenção dos processos metabólicos básicos (PARANYCHIANAKIS & CHARTZOULAKIS, 2005).

As relações entre matéria fresca da parte aérea e das raízes (MFPA/MFR) e matéria seca da parte aérea e das raízes (MSPA/MSR) para os cinco clones são mostradas na Figura 4. Na dose de 8 dS.m^{-1} , essas relações foram reduzidas significativamente apenas no clone CCP 76, embora na dose de 16 dS.m^{-1} , com exceção do BRS 189, todos os clones tenham apresentado reduções significativas nessas relações. Essas reduções evidenciam que o crescimento da parte aérea foi mais afetado pela salinidade do que o crescimento do sistema radicular. De acordo com Munns (2002), apesar das raízes estarem diretamente expostas ao agente responsável pelo estresse, elas são menos vulneráveis aos sais do que a parte aérea. A maior redução do crescimento da parte aérea em relação às raízes tem sido observada também em outras espécies frutíferas, sugerindo que elas se adaptam melhor às condições de salinidade, provavelmente, devido ao ajustamento osmótico mais rápido deste órgão (TATTINI *et al.*, 1995; HSIAO & XU, 2000; CHARTZOULAKIS *et al.*, 2002). Esta menor redução do crescimento das raízes pode resultar na ampliação da área de absorção de nutrientes e água do solo, de forma a minimizar os efeitos prejudiciais do sal (FERREIRA *et al.*, 2001).

Os cotilédones das plântulas de cajueiro anão-precoce sob estresse salino, apresentaram-se com valores de matérias fresca e seca maiores que aqueles do controle, evidenciando o efeito negativo da salinidade na mobilização das reservas da semente (Figura 5). No tratamento a 16 dS.m^{-1} , os clones CCP 09 e E 51 apresentaram cotilédones com médias de matérias frescas 45,1% e 118% maiores do que aquelas dos respectivos controles. Nesse mesmo nível de sal, na maioria dos clones estudados, as reduções das matérias secas foram semelhantes (em média 63%), com exceção do clone E 51, o qual apresentou matéria seca

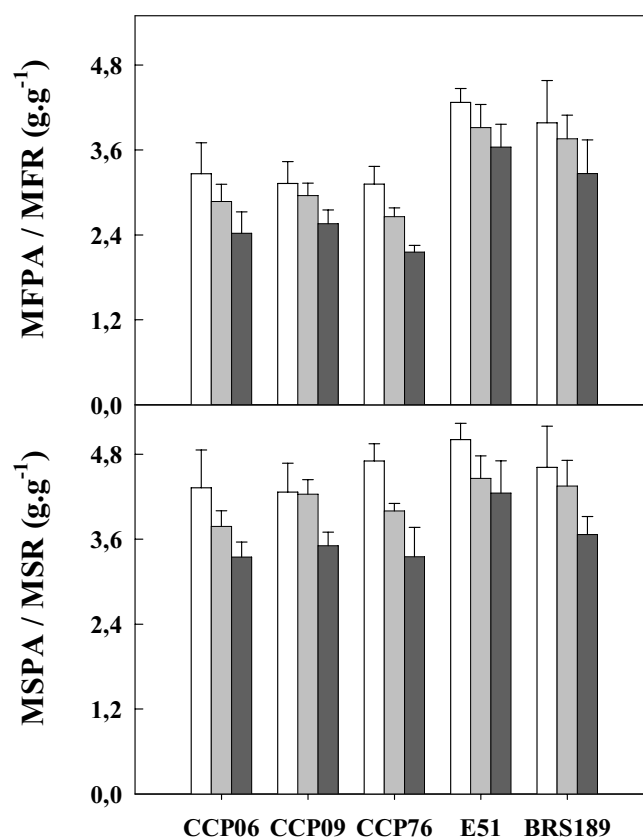


Figura 4. Relações entre matéria fresca da parte aérea e das raízes (MFPA/MFR) e entre matéria seca da parte aérea e das raízes (MSPA/MSR) de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (◻) e 16 (■) dS·m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

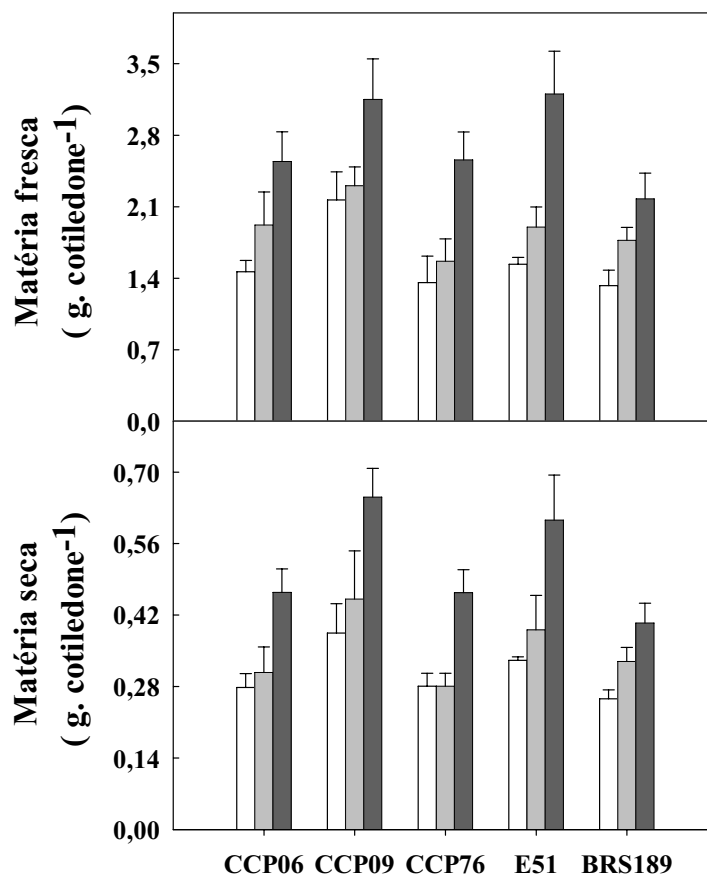


Figura 5. Matérias fresca e seca dos cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (◻) e 16 (◼) dS.m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

83% maior do que a do controle. Como observado por Almeida (2003) e Abreu (2004), tais resultados sugerem que o estresse salino inibiu a mobilização das substâncias de reserva dos cotilédones para as outras partes da planta, constituindo-se, então, em um fator causal da redução do crescimento das plantas.

Apesar de terem sido pequenas as diferenças dos efeitos da salinidade no crescimento dos cinco clones de cajueiro anão-precoce estudados, os clones CCP 06 e BRS 189 foram os que se apresentaram, respectivamente, como o mais sensível e o mais tolerante ao estresse salino. A Figura 6 ilustra a maior tolerância à salinidade do clone BRS 189 em relação ao CCP 06.

4.2. Trocas gasosas

A salinidade teve um efeito negativo sobre a fotossíntese líquida, condutância estomática e transpiração dos cinco clones de cajueiro anão-precoce estudados (Figura 7). O clone CCP 06, quando submetido ao tratamento salino a 8 dS.m^{-1} , foi o que teve a taxa fotossintética mais afetada, mostrando uma redução de aproximadamente 60%, em relação às plantas do tratamento controle. O clone menos afetado, nesse mesmo nível de salinidade, foi o BRS 189 que teve sua fotossíntese líquida reduzida, em relação ao controle, em apenas 26,7%. Este resultado, juntamente com a menor redução em área foliar pode explicar o fato do clone BRS 189 ter apresentado a menor redução no crescimento quando submetido à salinidade (Figura 2). Os clones CCP 09, CCP 76 e E 51 tiveram reduções na fotossíntese líquida de 37,6, 35,1 e 40,0%, respectivamente. No tratamento salino a 16 dS.m^{-1} , todos os clones tiveram forte redução na fotossíntese líquida, sendo o clone E 51 o mais afetado com uma redução de 88% em relação às plântulas controle, seguido do clone CCP 06 com uma



Figura 6. Plântulas dos clones CCP 06 e BRS 189 de cajueiro anão-precoce com 28 dias após a semeadura, sob condições controle (água destilada) e de estresse salino (NaCl) a 8 e 16 dS.m⁻¹ de condutividade elétrica.

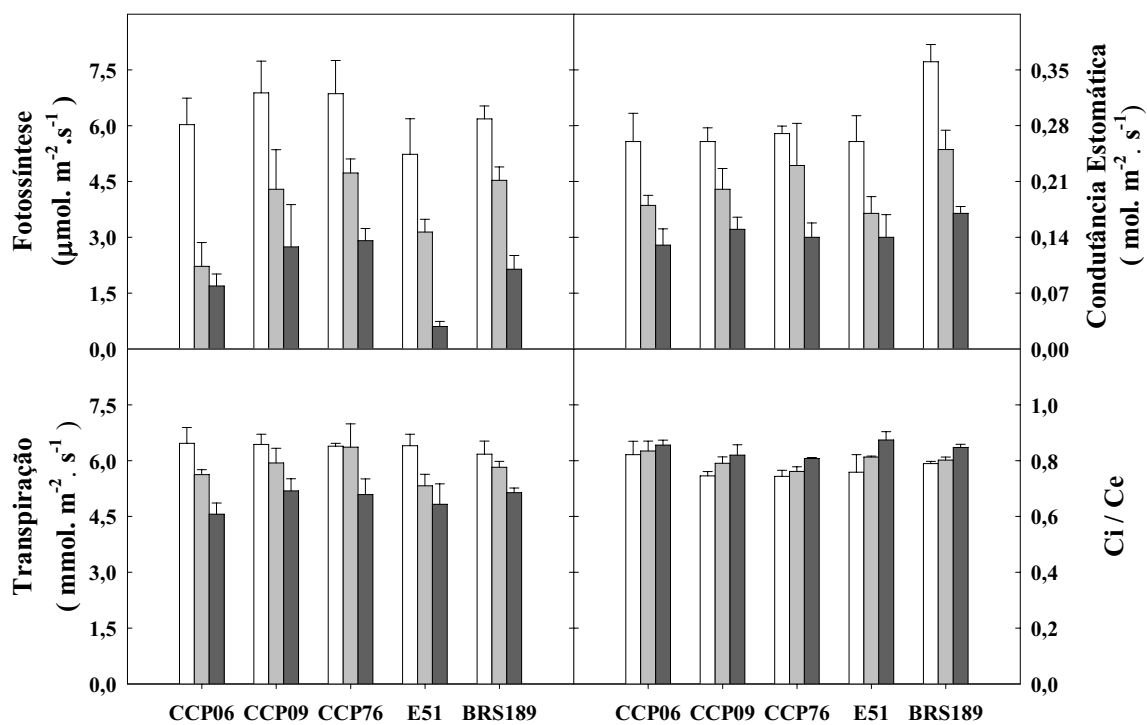


Figura 7. Fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração e relação entre a concentração de CO₂ interna e externa (Ci/Ce) de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (◻) e 16 (◼) dS.m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

redução de 72% e dos clones CCP 09, CCP 76 e BRS 189 com uma redução percentual média, de cerca de 60%. A redução mais severa no crescimento sob condições de estresse salino do clone CCP 06 foi consistente com o fato do mesmo ter apresentado também a maior redução na taxa fotossintética a 8 dS.m⁻¹ e a segunda maior a 16 dS.m⁻¹, confirmando ser o mais sensível dos clones estudados.

A condutância estomática foi outro parâmetro afetado negativamente pela salinidade nas plântulas de cajueiro anão-precoce (Figura 7). É interessante ressaltar que, em condições controle, observou-se uma maior condutância estomática nas plântulas do clone BRS 189, em relação à dos outros clones, com um valor superior em aproximadamente 30%. Excetuando-se o clone CCP 76, que não teve uma redução significativa na condutância estomática, os demais apresentaram reduções de aproximadamente 30% quando submetidos ao tratamento salino a 8 dS.m⁻¹. No nível mais alto de sal testado, o fechamento estomático foi maior no clone BRS 189, com uma redução de 53% na condutância estomática sendo, nos outros clones, observadas reduções menores do que 50% em relação ao controle. Embora o estresse salino tenha afetado significativamente a condutância estomática, não ocorreu um fechamento completo dos estômatos, mesmo na dose mais elevada de sal (16 dS.m⁻¹).

Os clones que diminuíram o fluxo transpiratório de forma significativa, quando submetidos à salinidade a 8 dS.m⁻¹, foram CCP 06 e E 51, com reduções de 12,9 e 16,8%, respectivamente (Figura 7). Quando as plântulas foram tratadas com o maior nível de sal, observou-se que o clone CCP 06 teve uma redução aproximada de 29,4%, sendo o mais afetado pela salinidade de todos os clones estudados. Nesse mesmo tratamento, a menor redução foi observada no clone BRS 189, que foi de 16,8%, em relação às plântulas controle. De acordo com Oertli (1968) e Greenway & Munns (1980), a redução na transpiração pode resultar em um incremento na concentração de íons no apoplasto, promovendo a saída de água do simplasto e acarretando desidratação e morte celulares. Chen *et al.* (2002) observaram que,

árvores de *Populus euphratica* com maior tolerância à salinidade do que outras espécies desse gênero, caracterizavam-se por manter uma taxa de transpiração pouco afetada, sob condições de estresse salino, e evitavam o aumento na concentração de íons no apoplasto através de um controle eficiente na restrição de seu transporte das raízes para a parte aérea.

A relação entre as concentrações interna e externa de CO₂ (C_i/C_e) foi pouco afetada pela salinidade nos clones analisados (Figura 7). Os resultados apresentados mostram que as reduções na condutância estomática e na fotossíntese líquida não foram acompanhadas de reduções nas concentrações internas de CO₂ nas folhas. De acordo com Kozłowski (1997), isso sugere que fatores não associados aos estômatos estariam envolvidos com a redução na taxa fotossintética. Pezeshki (1988), citado por Kozłowski (1997), descreveu uma situação similar na árvore *Taxodium distichum* em que a causa primária na redução das respostas fotossintéticas ao estresse salino, deveu-se ao elevado acúmulo de íons nas folhas, provocando danos no sistema fotorreceptor e nas enzimas que participam do processo fotossintético. Analisando as trocas gasosas em combinações de enxerto/porta-enxerto em plantas de *Prunus*, Massai *et al.* (2004) mostraram que a relação entre as pressões parciais interna e externa de CO₂ aumentou em função da concentração e do tempo de exposição aos sais, sendo as reações bioquímicas da fotossíntese limitadas pelo excessivo nível de sais nas folhas. Brugnoli & Lauteri (1991) descreveram esse mesmo fenômeno em plantas de *Phaseolus vulgaris* e consideraram que tal interpretação pode ser incorreta, indicando que a estimativa da concentração interna de CO₂ pode ser superestimada como consequência da heterogeneidade na abertura estomática das plantas cultivadas sob condições de estresse salino. De forma contrária, em outras árvores frutíferas submetidas a estresse salino foram observadas reduções na assimilação líquida de CO₂ provocadas apenas por limitações na difusão do CO₂ através dos poros estomáticos (LLOYD *et al.* 1990; BAÑULUS & PRIMOMILLO, 1992). Paranychianakis & Chartzoulakis (2005), apontaram que a redução na

fotossíntese pode ser provocada por mudanças na anatomia foliar induzidas pelos estresses hídrico e salino que aumentam a resistência das células do mesofilo à difusão de CO₂, limitando sua fixação nos cloroplastos. Muitas enzimas que participam do metabolismo do carbono são sensíveis à toxicidade gerada pelo acúmulo dos íons Na⁺ e Cl⁻ nas folhas, e às mudanças na estrutura citoplasmática provocadas pelo estresse salino (PARIDA & DAS, 2005).

4.3. Relações hídricas e potencial osmótico

4.3.1. Teor de água e suculência foliar

Na Figura 8 são apresentados os valores do teor de água nas folhas e raízes e os de suculência foliar dos cinco clones de cajueiro anão-precoce. Como pode ser observado, os tratamentos salinos não afetaram significativamente o teor de água, expresso com base na matéria seca, das folhas e raízes quando comparados com aquele das plântulas controle. No entanto, os clones analisados mostraram diferenças quanto aos teores de água tanto nas folhas como nas raízes, tendo os clones CCP 06, CCP 09 e CCP 76 apresentado valores maiores do que aqueles do BRS 189 e E 51. É conveniente ressaltar que, quando os valores dos teores de água foram expressos em função da matéria fresca, não foram observadas diferenças em relação ao controle entre o conteúdo de água nas folhas e raízes e nem entre os clones estudados (dados não apresentados). Viégas *et al.* (2001) determinaram os teores de água em função da matéria fresca, em folhas, caules e raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce submetidas a estresse salino (50 e 100 mol. m⁻³) e observaram que os valores não diferiram estatisticamente em relação àqueles das plantas controle. É possível, portanto, que as plantas de cajueiro anão-precoce desenvolvam um mecanismo de ajustamento osmótico efetivo para

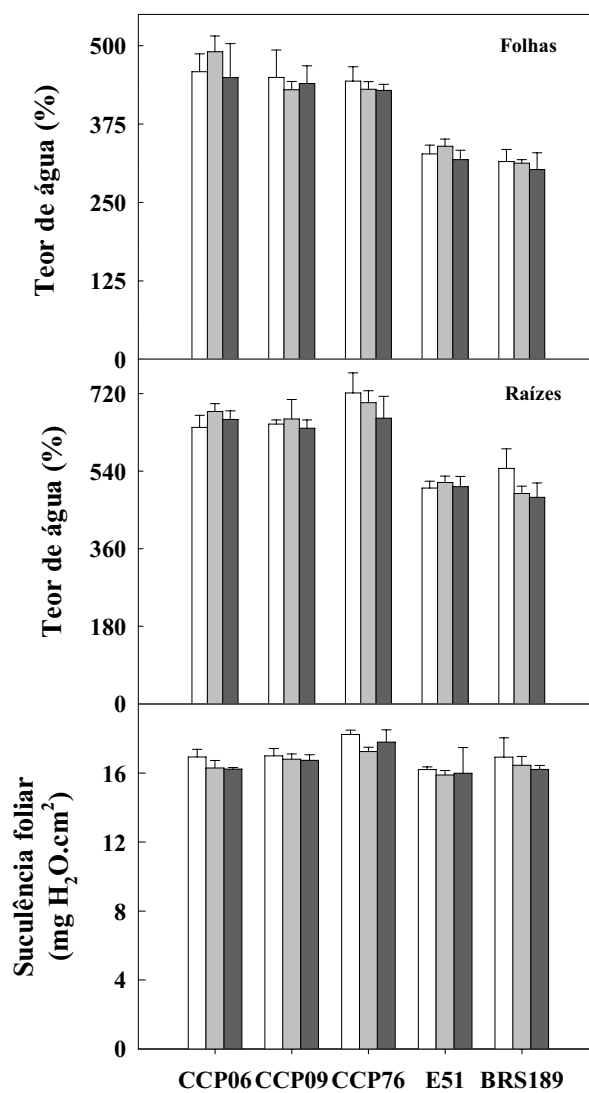


Figura 8. Teores de água, com base na matéria seca, de folhas e raízes e, suculência foliar de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (▒) e 16 (■) dS.m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

regular sua homeostase hídrica a valores similares àqueles observados nas plantas controle, através da compartimentalização de íons e da síntese de solutos orgânico no citosol.

A suculência foliar não foi alterada pela salinidade em nenhum dos clones estudados (Figura 8). Todavia, Carneiro *et al.* (2002) analisaram diferentes clones de cajueiro submetidos a 0,7, 1,4, 2,1 e 2,8 dS.m⁻¹ da água de irrigação e notaram que os teores de água nas folhas aumentaram linearmente conforme a salinidade aumentou. Esse resultado sugere que em baixos níveis de sais, as plântulas de cajueiro anão-precoce podem responder à salinidade aumentando a suculência foliar, diluindo, assim, os íons acumulados nas folhas e minimizando seus efeitos tóxicos (GREENWAY & MUNSS, 1980). Entretanto, esta resposta fisiológica pode não ser evidente em níveis elevados de salinidade.

Como se sabe, muitos processos fisiológicos como a fotossíntese e as trocas gasosas dependem da turgescência celular (KAISER, 1987; PARIDA & DAS, 2005). No entanto, os resultados aqui apresentados sugerem que a redução na taxa fotossintética pela salinidade (Figura 7) não parece estar associada a uma redução na turgescência celular e sim a uma provável toxicidade provocada pelo acúmulo dos íons Na⁺ e Cl⁻ nas folhas. De acordo com Greenway & Munns (1980) e Hasegawa *et al.* (2000), esses íons quando acumulados em excesso provocam desbalanceamento nutricional e metabólico, inibindo a atividade de enzimas, principalmente aquelas citosólicas.

4.3.2. Potencial osmótico

Os efeitos da salinidade sobre o potencial osmótico (Ψ_s) de folhas e raízes dos clones de cajueiro anão-precoce são apresentados na Figura 9. Nas folhas, o Ψ_s não foi alterado significativamente pelo tratamento salino a 8 dS.m⁻¹, exceto no clone BRS 189 que mostrou

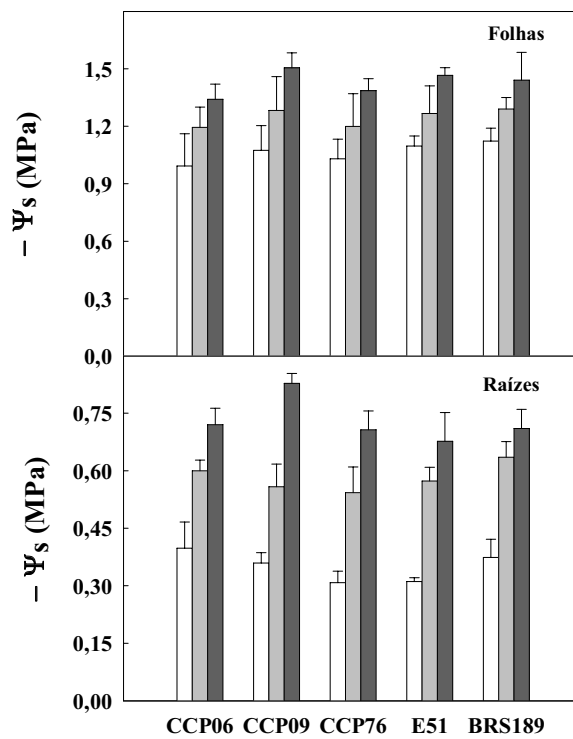


Figura 9. Potenciais osmóticos (Ψ_s) em folhas e raízes de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (\square) e de estresse salino (NaCl) a 8 (\square) e 16 (\blacksquare) $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$. As barras representam o desvio padrão.

uma diminuição de 14,9% em relação ao controle. Por outro lado, nesses mesmos tecidos, no tratamento salino a 16 dS.m⁻¹, todos os clones apresentaram reduções significativas no Ψ_s , sendo o BRS 189 aquele que teve menor redução (28,3%) em relação às plantas controle. Diferentes autores relataram que a redução do Ψ_s foliar em plantas lenhosas submetidas à salinidade tem como principal causa a absorção dos íons Na⁺ e Cl⁻, porém a contribuição das diferentes classes de solutos orgânicos para o ajustamento osmótico varia com a espécie vegetal e a intensidade do estresse (MASSAI *et al.*, 2004; CHARTZOULAKIS, 2005; OTTOW *et al.*, 2005).

As principais mudanças no Ψ_s foram registradas nas raízes, observando-se reduções significativas, em relação ao controle, nos dois tratamentos salinos (Figura 9). Os clones CCP 06 e E 51 foram os que apresentaram, respectivamente, a menor e a maior redução no Ψ_s quando submetidos a 8 dS.m⁻¹, apresentando valores 50 e 84% menores do que aquele dos controle. No entanto, quando a salinidade da solução de irrigação foi de 16 dS.m⁻¹, os clones CCP 09, CCP 76 e E 51 tiveram reduções maiores do que 120%, enquanto que as reduções no Ψ_s dos clones CCP 06 e BRS 189 foram de 80 e 90%, respectivamente.

Medições de Ψ_s em raízes de plantas cultivadas em condições de estresse salino são escassas. Alguns autores acreditam que as variações observadas devem-se, principalmente, à síntese de osmorreguladores e à compartimentalização de íons, sendo pouca a contribuição do potássio, pois as concentrações desse íon nas raízes diminuem durante o período de estresse salino (MUNNS, 2002).

Para todos os clones analisados nos diferentes tratamentos, observou-se que o Ψ_s da folha foi sempre menor do que aquele das raízes. Isto sugere um ajustamento osmótico efetivo, das diferentes partes da planta, capaz de manter o gradiente de potencial hídrico e a turgescência dos diferentes tecidos.

4.4. Solutos inorgânicos e orgânicos

4.4.1. Solutos inorgânicos

Utilizando os cinco clones de cajueiro anão-precoce, foram estudados os efeitos da salinidade sobre os teores dos íons Na^+ , Cl^- e K^+ , expressos com base na matéria seca, sendo as determinações feitas em folhas, caules + pecíolos, raízes e cotilédones.

4.4.1.1. Teores de sódio

Os teores de sódio aumentaram em resposta à salinidade nas diversas partes das plântulas dos cinco clones de cajueiro anão-precoce estudados (Figura 10). Contudo, diferenças genótípicas em relação à regulação das concentrações de Na^+ na raiz e na parte aérea foram detectadas. Na dose de 8 dS.m^{-1} , o clone BRS 189 foi o que apresentou maior aumento no teor de sódio nas raízes, em relação ao controle (96%), seguido dos clones CCP 09 e CCP 76 (85%), CCP 06 (57%) e E 51 (42%). Porém, nessa mesma dose de sal, o transporte de sódio para a parte aérea da plântula, isto é, seu acúmulo nos caules + pecíolos e nas folhas foi melhor regulado nos clones BRS 189 e CCP 09, com aumentos em relação aos controles de 58 e 64% e de 73 e 52%, respectivamente. Por outro lado, o clone CCP 06 foi o que acumulou mais sódio na parte aérea com aumentos de 105 e 90% nos caules + pecíolos e nas folhas, respectivamente. Esses resultados sugerem que o clone CCP 06 parece possuir um mecanismo de controle do transporte desse íon para a parte aérea menos eficiente do que os outros clones estudados.

O controle do transporte de íons para a parte aérea da planta, por meio do seu acúmulo nas raízes, tem sido proposto como uma característica de tolerância, particularmente importante em glicófitas (MUNNS, 2002). Esse controle envolve processos que minimizam o

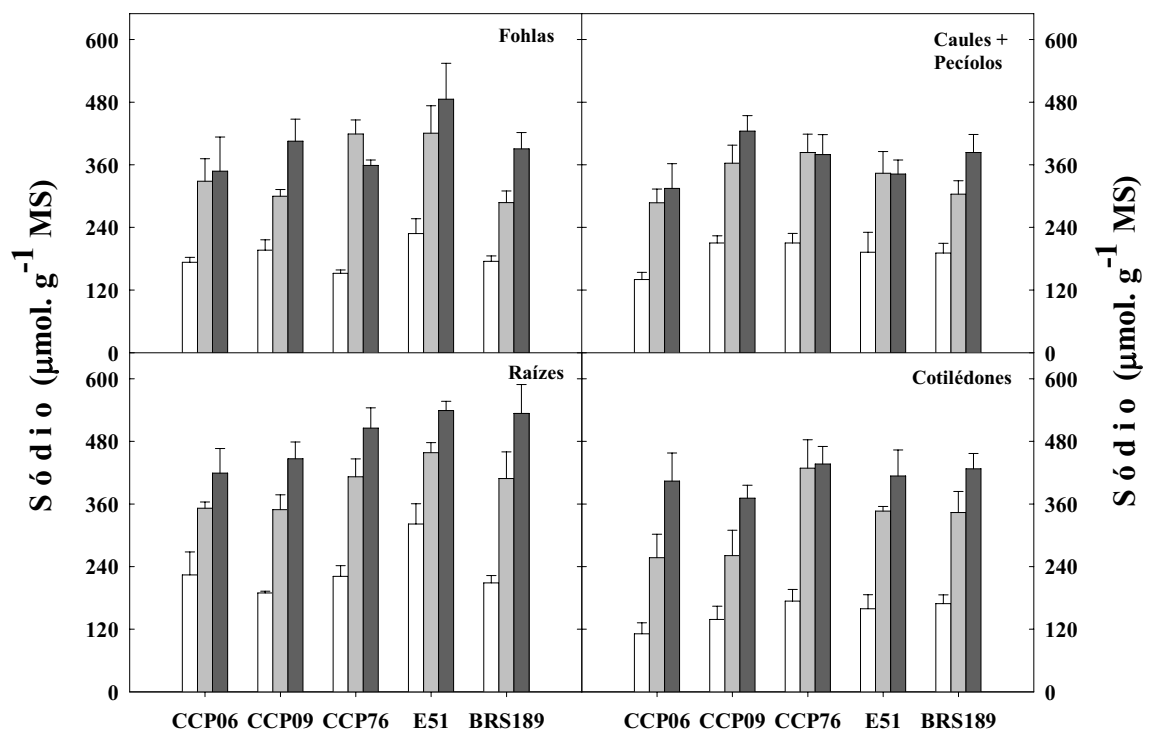


Figura 10. Teores de sódio em folhas, caules + pecíolos, raízes e cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (■) e 16 (■) dS.m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

efluxo de sais das raízes para a parte aérea ou que maximizam sua reabsorção no xilema radicular e caulinar (TESTER & DAVENPORT, 2003; PARANYCHIANAKIS & CHARTZOULAKIS, 2005). No entanto, estudos recentes questionam a acumulação de sais nas raízes como um mecanismo que induza tolerância à salinidade em condições de longa exposição ou em altos níveis de sais. Como observado por Chartzoulakis *et al.* (2002), cultivares de oliveira podem regular bem as concentrações de Na^+ na parte aérea quando submetidos a níveis baixos de salinidade, embora sintomas de toxicidade comecem a manifestar-se quando as concentrações de sais nas raízes são excessivamente altas. Concordando com isto, Garcia-Sanchez *et al.* (2002) observaram que diferenças significativas entre porta-enxertos de *Citrus* para seqüestrar sais nas raízes se tornavam evidentes quando as plantas eram irrigadas com NaCl a 30 e 60 mM, mas que tais diferenças eram eliminadas quando o tratamento salino envolvia uma concentração mais elevada de NaCl (90 mM). Os resultados apresentados na Figura 10 mostraram que os clones CCP 09 e BRS 189, que foram mais eficientes na regulação do íon Na^+ através da plântula quando o nível de salinidade foi de 8 dS.m^{-1} , também mostraram essa mesma eficiência no nível de salinidade mais alto (16 dS.m^{-1}).

De forma semelhante ao observado nas outras partes das plântulas dos cinco clones de cajueiro anão-precoce, os cotilédones apresentaram aumentos nos teores de Na^+ em resposta à salinidade (Figura 10). De modo geral, os teores de Na^+ nos cotilédones foram semelhantes àqueles observados nas folhas e caules + pecíolos, no entanto, os aumentos em relação ao controle, foram maiores nos cotilédones. É possível que os cotilédones sirvam de dreno para absorção desse íon tóxico e dessa forma possam minimizar seus efeitos deletérios nos tecidos fotossintéticos. Em apoio a esta idéia, resultados não apresentados mostraram que, levando-se em conta os cinco clones estudados, o acúmulo médio total de sódio nos cotilédones foi de

11,4% do observado na parte aérea (folhas e caules + pecíolos), enquanto na dose mais elevada este percentual foi de 24,3%.

4.4.1.2. Teores de cloreto

A salinidade também provocou aumentos nos teores de cloreto nas plântulas de cajueiro anão-precoce (Figura 11). No clone CCP 09 submetido a uma C.E. de 8 dS.m^{-1} , observou-se um aumento no teor desse íon nas raízes de 137%, em relação ao controle, sendo observados aumentos semelhantes nas folhas e caules + pecíolos. Apesar dos aumentos nos teores de cloreto nas raízes dos clones BRS 189 e CCP 06, nessa dose de sal (8 dS.m^{-1}), terem sido da mesma ordem de grandeza (cerca de 180%), na parte aérea esses aumentos foram bem mais elevados. No BRS 189, os aumentos nos teores de cloreto nos caules + pecíolos e nas folhas foram, respectivamente, de 317% e 260%, enquanto no CCP 06 esses aumentos foram de 570 e 390%. Essa mesma tendência também foi observada com relação aos clones CCP 76 e E 51. Portanto, os resultados apresentados sugerem que o clone CCP 09 foi o que melhor excluiu o íon cloreto da parte aérea. O controle no transporte de cloreto das raízes para a parte aérea parece ser essencial para a tolerância à salinidade, pois plantas lenhosas e particularmente árvores frutíferas, são mais sensíveis ao cloreto do que ao sódio (MAAS, 1996).

Nos cotilédones, de forma semelhante ao observado nas outras partes das plântulas dos cinco clones de cajueiro anão-precoce, também foram detectados aumentos nos teores de Cl^- em resposta ao estresse salino (Figura 11). De modo geral, o acúmulo de Cl^- nos cotilédones dos cinco clones estudados foi maior do que nas outras partes da plântula. No tratamento salino a 16 dS.m^{-1} , os aumentos nos teores médios desse íon nos cotilédones, em relação ao

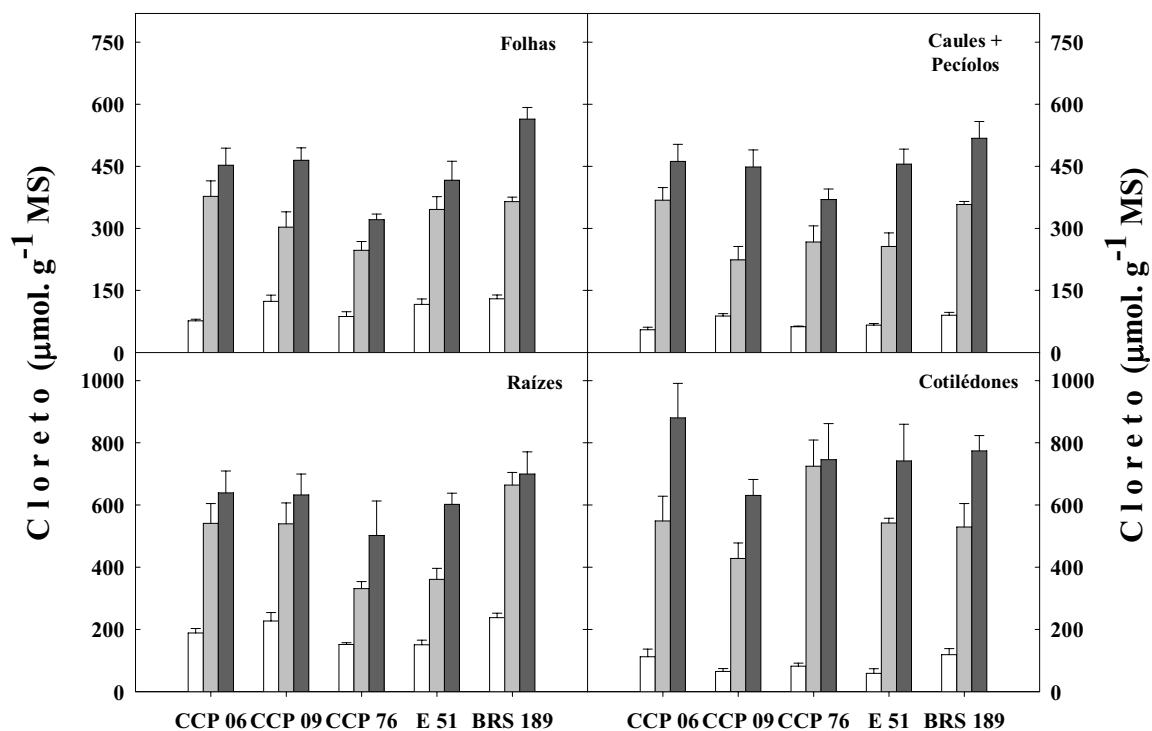


Figura 11. Teores de cloreto em folhas, caules + pecíolos, raízes e cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (■) e 16 (■) dS.m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

controle, foram em média de 1.456,1% enquanto nas raízes, caules + pecíolos e folhas os aumentos foram de 228%, 541% e 325%, respectivamente. Portanto, da mesma forma que para o caso do íon sódio, pode-se supor que os cotilédones também sirvam de dreno para a absorção de cloreto, minimizando os efeitos deletérios deste íon tóxico nos tecidos fotossintéticos. Resultados não apresentados mostraram que, levando-se em conta os cinco clones estudados, o acúmulo médio total de cloreto nos cotilédones foi de 20,6% daquele da parte aérea (folhas e caules + pecíolos), enquanto na dose mais elevada este valor foi de 38,5%.

As relações iônicas, envolvendo os íons Cl^- e Na^+ , foram também confirmadas quando se analisou o acúmulo total desses íons na parte aérea (folhas e caules + pecíolos) e raízes. Resultados não apresentados mostraram que os clones BRS 189, CCP 09 e CCP 76 foram os que mais acumularam sódio nas raízes, porém o BRS 189 foi o que menos acumulou esse íon na parte aérea, sugerindo que esse clone foi o mais eficiente na compartimentalização do íon sódio nas raízes. Por outro lado, quando tal análise foi feita com relação ao acúmulo total de cloreto, o clone CCP 09 foi o que apresentou melhor controle no processo de translocação desse íon para a parte aérea da plântula.

4.4.1.3. Teores de potássio

Os teores de potássio nas folhas e nos caules + pecíolos dos clones CCP 06, CCP 76, E 51 e BRS 189 de cajueiro anão-precoce foram pouco afetados pela salinidade (Figura 12). No tratamento salino a 8 dS.m^{-1} , o clone CCP 09 foi o único que apresentou reduções significativas, em relação ao controle, nos teores de potássio nas folhas e caules + pecíolos, com diminuições de 24,5 e 20,9%, respectivamente. Contudo, com o aumento da C.E. para 16 dS.m^{-1} , observou-se uma leve recuperação, em relação ao tratamento anterior, sendo os teores

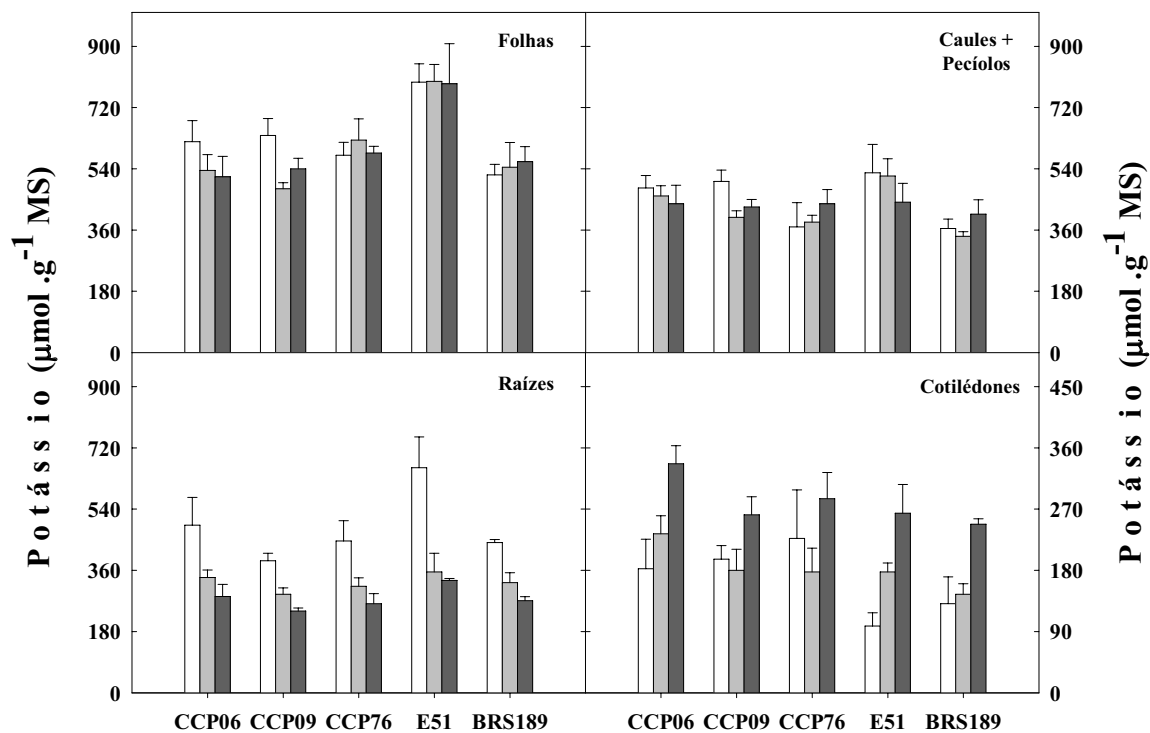


Figura 12. Teores de potássio em folhas, caules + pecíolos, raízes e cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (◻) e 16 (■) dS.m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

de potássio tanto nas folhas como nos caules apenas 15% menores do que aqueles das plântulas controle.

Os teores de K^+ foliares, de forma semelhante ao observado aqui, também não foram alterados pela salinidade nas espécies frutíferas *Tamarindus indica* (GEBAUER *et al.*, 2004) e *Prunus persica* (MASSAI *et al.*, 2004) e na halófito *Bruguiera parviflora* (PARIDA *et al.*, 2004). Ottow *et al.* (2005) observaram que a habilidade da lenhosa *Populus euphratica* para tolerar níveis elevados de sais depende também da regulação da homeostase do potássio durante o estresse salino. Portanto, a pouca alteração nos teores de potássio na parte aérea das plântulas de cajueiro (Figura 12), pelo menos no estágio de desenvolvimento estudado, pode representar uma resposta adaptativa, desde que o K^+ é um íon essencial para a atividade de muitas enzimas, bem como para a regulação da turgescência e força iônica celulares (YEO, 1983).

De forma contrária ao observado na parte aérea, a salinidade afetou significativamente os teores de potássio nas raízes (Figura 12). No tratamento salino a 8 dS.m^{-1} , os clones apresentaram reduções nos teores desse íon que variaram de 25,3% (CCP 09) a 46,3% (E 51). Essas reduções nos teores de K^+ foram um pouco mais acentuadas no tratamento a 16 dS.m^{-1} .

Reduções nos teores de potássio nas raízes com o aumento da salinidade no meio de crescimento, também, têm sido encontradas em cultivares de goiabeira (FERREIRA *et al.*, 2001), oliveira (CHARTZOULAKIS *et al.*, 2002) e gravioleira (TÁVORA *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). De acordo com Hirsch & Sussman (1999), os sistemas de absorção de potássio são altamente seletivos, quando na zona radicular, as concentrações de K^+ e Na^+ são semelhantes. No entanto, esses transportadores podem ser utilizados para a

absorção de Na^+ quando esse íon encontra-se em excesso em relação ao K^+ . Esta situação é semelhante às condições experimentais do presente trabalho. 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).

Diferentemente do observado nas outras partes das plântulas, os teores de potássio nos cotilédones das plântulas de cajueiro anão-precoce sob condições salinas, apresentaram-se mais elevados do que aqueles dos controles (Figura 12). Esses aumentos nos teores de K^+ podem ser atribuídos aos efeitos da salinidade na mobilização das reservas cotiledonárias, dificultando a translocação deste íon dos cotilédones para as outras partes da plântula.

4.4.1.4. Relação Na^+/K^+

Nas diversas partes das plântulas dos clones de cajueiro anão-precoce, foram observados aumentos na relação Na^+/K^+ com o aumento da salinidade (Figura 13). Nas raízes, os maiores incrementos nessa relação, em relação ao controle, foram observados nos clones BRS 189 e CCP 76, sendo o clone CCP 06 aquele que apresentou menor aumento. Tais resultados foram concordantes com os apresentados na Figura 10, que mostram que BRS 189 e CCP 06 foram os clones que apresentaram, respectivamente, o maior e o menor acúmulo de Na^+ em suas raízes. Por outro lado, no tratamento a 8 dS.m^{-1} , o clone BRS 189 foi o que apresentou menor aumento percentual na relação Na^+/K^+ nas folhas (73%) e caules + pecíolos (71%) (Figura 13). Em contraste, o clone CCP 06 foi o que apresentou, nesse mesmo nível de salinidade, os maiores valores nessa relação, com aumentos de 113 e 117% para caules + pecíolos e folhas, respectivamente. Quando as plantas foram submetidas a uma dose mais elevada de sais (16 dS.m^{-1}), a relação Na^+/K^+ na parte aérea das plantas não apresentou aumentos significativos em relação ao tratamento a 8 dS.m^{-1} . Taleisnik & Grunberg (1994)

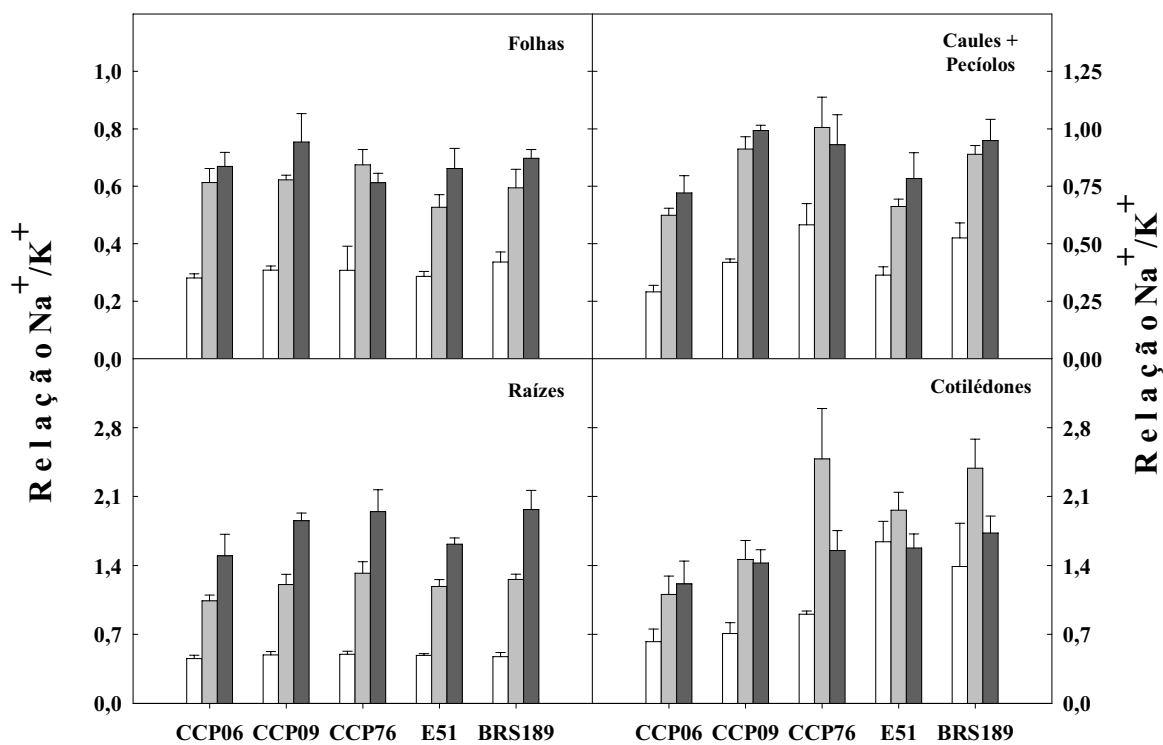


Figura 13. Relação Na^+/K^+ em folhas, caules + pecíolos, raízes e cotilédones de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (◻) e 16 (◼) $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$. As barras representam o desvio padrão.

apontaram que o equilíbrio entre as concentrações dos íons Na^+ e K^+ em plantas cultivadas sob condições de estresse salino depende de uma adequada nutrição potássica. Tendo como base esta idéia, o grande aumento na relação Na^+/K^+ na parte aérea provocado pela salinidade (Figura 13), pode ser explicado pelas condições experimentais aqui empregadas, em que a ausência de nutrientes essenciais na água de irrigação, tais como o K^+ , pode ter favorecido a absorção do Na^+ . No entanto, Viégas *et al.* (2001) observaram que, plantas de cajueiro cultivadas em solução hidropônica e submetidas a estresse salino, mostraram também um aumento na relação Na^+/K^+ nas folhas. Isto sugere que, o aumento nas concentrações de sódio na parte aérea pode estar relacionado a uma baixa seletividade dos sistemas de absorção de potássio. Portanto, o aumento na seletividade ao K^+ pode representar um importante mecanismo para aumentar a tolerância das plantas de cajueiro ao estresse salino (VIÉGAS *et al.*, 2001) e que deve ser considerado nos programas de melhoramento desta importante cultura.

A tolerância à salinidade em árvores frutíferas e espécies de culturas anuais é atribuída, principalmente, a sua capacidade para excluir os íons tóxicos sódio e cloreto (GREENWAY & MUNNS, 1980; STOREY & WALKER, 1999). Nas plantas perenes, a exclusão de sais é particularmente importante desde que, nessas plantas, as folhas permanecem por longos períodos de tempo (um ano ou mais) e o acúmulo de íons seria altamente prejudicial à fotossíntese (MUNNS, 2002).

4.4.2. Solutos orgânicos

A salinidade provocou aumento, em relação ao controle, na concentração de prolina no suco radicular, porém no tratamento a 8 dS.m^{-1} esse aumento só foi significativo nos clones BRS 189 (70%) e E 51 (175%), conforme observado na Figura 14. No tratamento

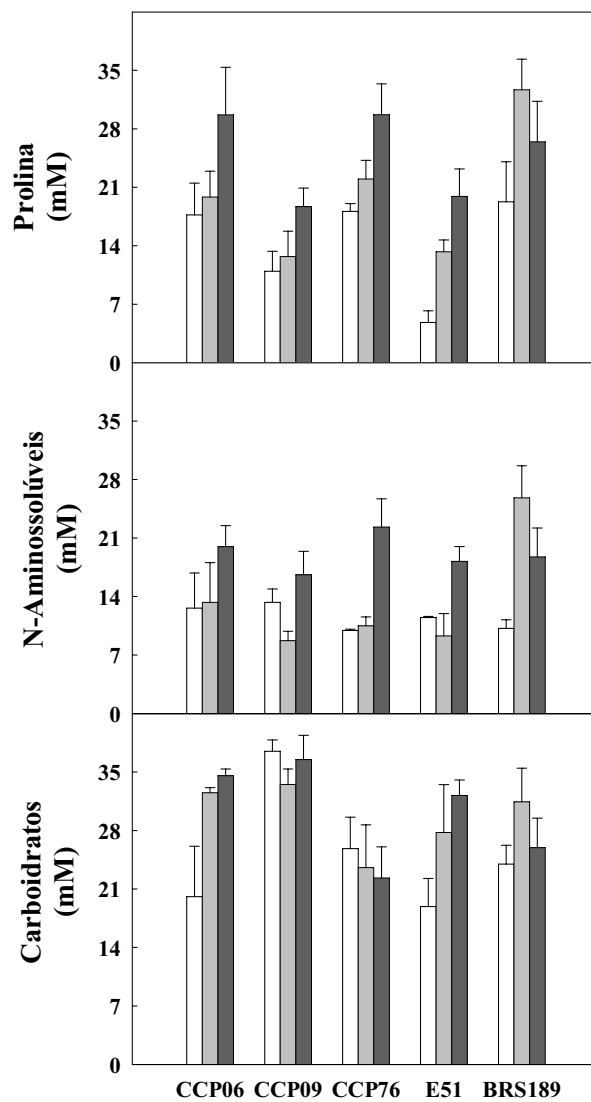


Figura 14. Concentrações de prolina, N-aminossolúveis e carboidratos solúveis no suco extraído de raízes de plântulas de cinco clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 (▒) e 16 (■) dS.m⁻¹. As barras representam o desvio padrão.

salino a 16 dS.m^{-1} , as concentrações de prolina aumentaram significativamente, em relação ao controle, em todos os clones estudados, exceto no BRS 189. Convém ressaltar, no entanto, que nesse clone a concentração de prolina, que aumentou no tratamento a 8 dS.m^{-1} , não diferiu significativamente daquela do tratamento a 16 dS.m^{-1} . Esses resultados concordam com os relatados por Abreu (2004), que observou incrementos da ordem de 100% nos teores de prolina em raízes das plântulas do clone CCP 06, submetido à salinidade (NaCl a $20,6 \text{ dS.m}^{-1}$). É importante destacar que, em termos absolutos, o BRS 189 foi, dentre os clones estudados, aquele que apresentou a mais elevada concentração de prolina, o que pode representar um mecanismo importante para ajustamento osmótico desse clone ao estresse salino, além de poder contribuir para mitigar os efeitos deletérios dos íons Na^+ e Cl^- na estabilidade das membranas (ASHRAF & HARRIS, 2004).

Em relação às concentrações de N-aminossolúveis, o BRS 189 foi o único, dentre os clones estudados, que apresentou aumento significativo (cerca de 150%) em relação às plantas controle, quando submetido ao tratamento salino a 8 dS.m^{-1} (Figura 14). No maior nível de sal testado, foram observados incrementos significativos nos teores desses osmorreguladores nos clones CCP 76 (124%), BRS 189 (84%), CCP 06 e E 51(58%), em relação a seus respectivos controles.

De acordo com Rhodes & Hanson (1993), o acúmulo ou o aumento, induzidos pela salinidade, na concentração de N-aminossolúveis, como a glicina-betaina, prolina-betaine entre outros, correlacionam-se com uma maior tolerância ao estresse salino. Além de seu papel na osmorregulação, tem sido proposto que os N-aminossolúveis participam na redução do nível de peroxidação dos lipídios de membranas e na proteção de macromoléculas a diversos estresses ambientais (CHEN & MURATA, 2002).

As concentrações de carboidratos solúveis presentes no suco radicular dos clones CCP 09, E 51 e CCP 76 não foram afetadas significativamente pela salinidade a 8 dS.m^{-1} , enquanto

que aquelas dos clones CCP 06 e BRS 189 apresentaram incrementos significativos de 62 e 30,9%, respectivamente, em relação às plantas controle (Figura 14). No tratamento salino a 16 dS.m⁻¹, os clones CCP 06 e E 51 foram os únicos que apresentaram aumentos significativos em concentração de carboidratos solúveis, com aumentos da ordem de 72% em relação aos respectivos controle. Apesar dos clones CCP 06 e E 51 terem apresentado as maiores reduções em fotossíntese líquida (Figura 7), eles foram os que apresentaram os maiores incrementos nas concentrações de carboidratos solúveis nas raízes. Os resultados aqui apresentados discordam daqueles de Abreu (2004) que observou que a salinidade não influenciou os teores de carboidratos solúveis nas raízes do clone CCP 06, concluindo ser desprezível o papel desses osmólitos no processo de osmorregulação.

O maior acúmulo em N-aminossolúveis e prolina pela salinidade observado no clone BRS 189, em relação aos outros clones estudados, pode representar uma vantagem adaptativa desse clone, tendo em vista o reconhecido papel desses solutos no ajustamento osmótico e na proteção de estrutura celulares sob condições de estresse salino (RHODES & HANSON 1993; TESTER & DAVENPORT, 2003; ASHRAF & HARRIS, 2004).

4.5. H⁺-ATPase de membrana plasmática

Para estudar o efeito da salinidade sobre a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática de raízes de plântulas de cajueiro anão-precoce e determinar seu papel no mecanismo de tolerância ao estresse salino, foram utilizados os clones CCP 06 e BRS 189. Esses clones foram utilizados por terem se mostrado, dentre os cinco clones de cajueiro anão-precoce estudados, como o menos e o mais eficiente na regulação das concentrações do sódio nas raízes e folhas, respectivamente, além de terem apresentado a maior e a menor redução no crescimento quando submetidos a estresse salino. Para dispor de uma

quantidade maior de material para isolamento das membranas, optou-se por estudar os efeitos da salinidade no nível de C.E. de 8 dS.m^{-1} .

4.5.1. Caracterização e pureza das vesículas de membrana plasmática

A atividade da H^+ -ATPase foi estudada na fração enriquecida de vesículas de membrana plasmática, presente na interface 33/42% do gradiente descontínuo de sacarose empregado no isolamento das vesículas. A escolha desse gradiente teve por base as diferenças de densidade que apresentam as membranas vacuolar, celular e mitocondrial (HODGES *et al.*, 1972; LEONARD *et al.*, 1973). A membrana plasmática caracteriza-se por ter uma densidade entre $1,14$ e $1,18 \text{ g.cm}^{-3}$, valor compreendido entre as densidades de $1,14$ e $1,19 \text{ g.cm}^{-3}$ das soluções de sacarose a 33 e 42%, respectivamente. Dessa forma, a fração de vesículas de membrana plasmática, quando submetida a uma ultracentrifugação, atinge um ponto de equilíbrio na interface das duas soluções de sacarose. A membrana vacuolar, por ter uma densidade menor do que a da solução de sacarose a 33%, fica retida na superfície desta solução, e separada do restante das vesículas de membranas. Por outro lado, a membrana mitocondrial, por ser um pouco mais densa ($1,18$ a $1,20 \text{ g.cm}^{-3}$) do que a membrana plasmática pode representar uma fonte de contaminação importante, devendo, portanto, ser estimada nos estudos efetuados com as membranas plasmáticas.

A fim de estimar o grau de purificação das vesículas obtidas na interface 33/42% do gradiente de sacarose, os ensaios foram realizados a pH 6,5, por ser este o ótimo de pH de atividade das H^+ -ATPases de membrana plasmática (LEONARD *et al.*, 1973; QUAIL, 1979; SZE, 1985). Além disso, os ensaios foram realizados na presença de inibidores específicos de fosfohidrolases, enzimas potencialmente capazes de hidrolisar o ATP.

Os resultados apresentados na Figura 15 mostram a atividade da H⁺-ATPase das vesículas de membrana isoladas de raízes de plântulas dos clones CCP 06 e BRS 189 sob condições controle e de estresse salino (8 dS.m⁻¹). Todas as frações dessas vesículas foram capazes de hidrolisar o ATP em presença de molibdato (1,0 mM), um inibidor específico de fosfatases ácidas (YAN *et al.*, 1998), o que exclui a possibilidade da referida hidrólise do ATP ser devida a essas enzimas. Considerando esta atividade como 100%, estimou-se a atividade das vesículas de membrana de hidrolisar o ATP em presença de molibdato e azida sódica, esta última um inibidor específico da ATPase mitocondrial (YAN *et al.*, 1998). Como pode ser observada, a atividade de hidrólise do ATP das quatro frações de membrana foi pouco afetada pela azida sódica, com uma redução média de apenas 12%, o que sugere uma baixa contaminação da preparação de membrana aqui isolada com membrana mitocondrial. Por outro lado, quando se testou a capacidade de hidrólise do ATP da fração de vesículas de membrana em presença dos dois inibidores anteriores mais o ortovanadato, este um inibidor específico da ATPase de membrana plasmática (YAN *et al.*, 1998), a atividade ATPásica foi reduzida em cerca de 70%, o que demonstra a predominância de vesículas de membrana plasmática na fração membranar isolada de raízes de cajueiro anão-precoce.

Tendo em vista os resultados obtidos acima, a atividade H⁺-ATPásica das vesículas enriquecidas com membrana plasmática foram estimadas pela diferença do valor de atividade em presença de molibdato e azida sódica daquela em presença de molibdato, azida sódica e ortovanadato.

4.5.2. Efeitos da salinidade na atividade enzimática

Os efeitos da salinidade na atividade específica da H⁺-ATPase de membrana plasmática isolada de raízes dos clones CCP 06 (sensível) e BRS 189 (tolerante) são mostrados na figura

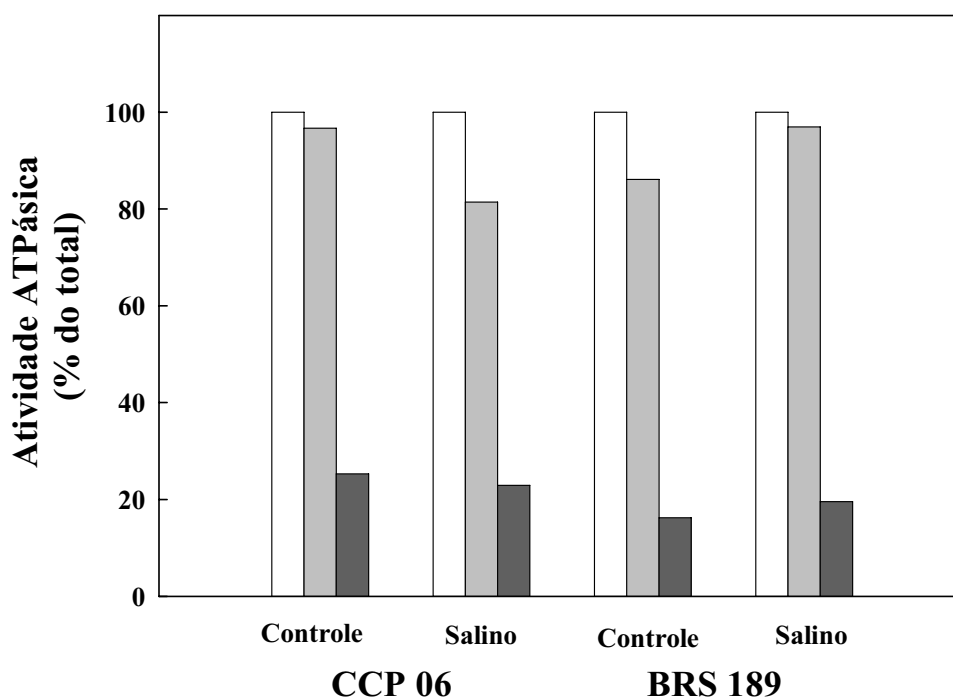


Figura 15. Atividade ATPásica da fração membrana isolada de raízes de plântulas de dois clones de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino (NaCl) a 8 dS.m^{-1} de condutividade elétrica, em presença de molibdato – atividade total (□); de molibdato + azida sódica (■) e de molibdato + azida sódica + vanadato (■).

16. Sob condições controle, as H⁺-ATPases de raízes de ambos os clones mostraram iguais atividades específicas, com um valor aproximado de 0,1 μmol Pi.mg⁻¹ Prot.min⁻¹. Contudo, sob condições de salinidade, enquanto observou-se no clone tolerante um forte estímulo na atividade da H⁺-ATPase (aumento de 131%, em relação ao controle), no clone sensível aos sais não foi observada alteração significativa em atividade dessa enzima (Figura 16).

O aumento em atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática do BRS 189 sugere que esse clone responde ao estresse salino através da ativação de um mecanismo celular de exclusão de íons. Como se sabe, as H⁺-ATPases juntamente com o antiporte Na⁺/H⁺, formam parte de um sistema que controla o efluxo de sódio através da membrana plasmática (BLUMWALD *et al.*, 2000; ZHU, 2003). Assim, a ativação desse mecanismo pode contribuir para uma regulação mais eficiente das concentrações de sódio na planta inteira ao reduzir as concentrações desse íon no simplasto das células da raiz, diminuindo seu transporte para a parte aérea da planta. Em apoio a esta idéia, está o fato do BRS 189 ter sido o clone que menos acumulou íons sódio na parte aérea e mais nas raízes (Figura 10). É possível que o acúmulo deste íon nas raízes ocorra no apoplasto, entretanto não se pode descartar a possibilidade do clone BRS 189 ter reduzido o transporte de sódio para a parte aérea por tê-lo compartimentalizado no vacúolo das células das raízes. No entanto, somente estudos envolvendo as ATPases e pirofosfatases vacuolares poderão elucidar esta questão. De acordo com Niu *et al.* (1995), o mecanismo de exclusão celular é um processo crítico na regulação da homeostase iônica em ambientes salinos.

A maioria dos trabalhos sobre o efeito da salinidade na atividade da H⁺-ATPase tem sido realizada principalmente em raízes e folhas de plantas mono e dicotiledôneas não lenhosas ou em cultura de células (BEN-HAYYIM & RAN, 1990; BALLESTEROS *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-ROSALES *et al.*, 1999; KERKEB *et al.*, 2001).

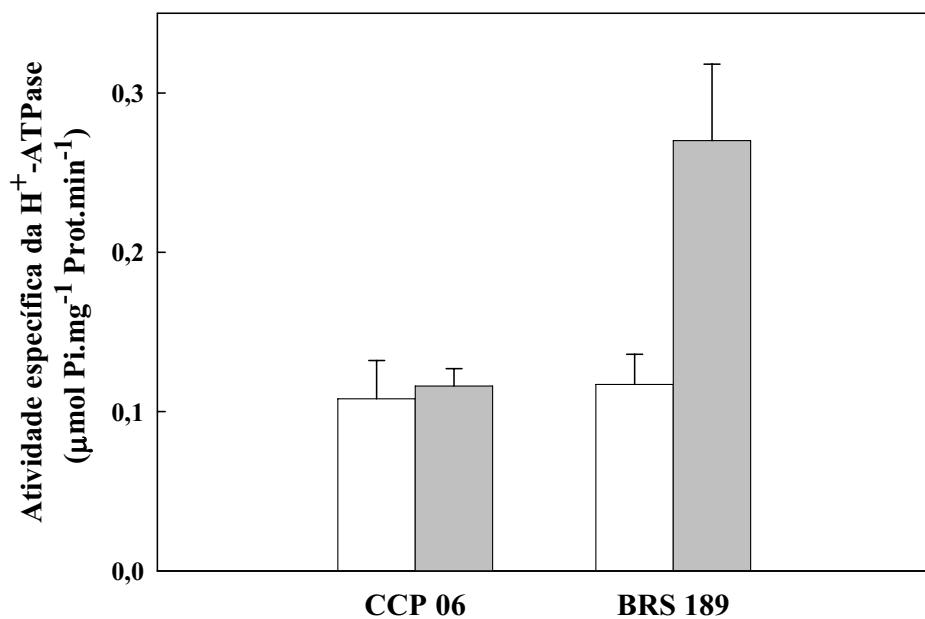


Figura 16. Atividade específica da H⁺-ATPase de membrana plasmática de raízes de plântulas dos clones CCP 06 (sensível) e BRS 189 (tolerante) de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 dS.m⁻¹ de condutividade elétrica (■). As barras representam o desvio padrão.

Talvez as dificuldades na obtenção de material experimental suficiente para a execução dos ensaios enzimáticos sejam responsáveis pela escassez de trabalhos com as H⁺-ATPases de raízes fibrosas de árvores frutíferas (MA *et al.*, 2002). No entanto, Douglas & Walker (1984), estudando a regulação das concentrações de Cl⁻ de três variedades de *Citrus*, determinaram a atividade ATPásica de membrana plasmática de raízes de plantas cultivadas em três níveis de salinidade e mostraram que o cultivar que se comportou como melhor excludor de Cl⁻ foi o que aumentou significativamente a atividade dessa enzima. Yang *et al.* (2004), trabalhando com dois cultivares de trigo com diferentes tolerâncias ao estresse salino, observaram mudanças significativas induzidas pelo NaCl apenas na atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática de raízes do cultivar resistente (L-Ch20).

O aumento na atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática no clone BRS 189 como resultado da exposição ao sal, pode ser interpretado de diferentes formas. O estresse salino pode ter aumentado o número de moléculas desta enzima por unidade de área de membrana plasmática, provavelmente por um estímulo na velocidade de síntese e/ou diminuição de sua degradação. Niu *et al.* (1993), mostraram que durante o estresse salino há uma indução na expressão dos genes das H⁺-ATPases de raízes tanto de halófitas quanto de glicófitas, sendo, no entanto, superior nas halófitas. Esses resultados sugerem o requerimento dessas bombas de prótons para o processo de aclimatação ou adaptação ao estresse salino. Ainda segundo esses autores, a forte expressão desses genes na zona de diferenciação e alongamento mostra a importância dessas regiões na regulação da homeostase iônica durante o processo de aclimatação ou adaptação à salinidade. Zhang *et al.* (1999), também estudaram a expressão da H⁺-ATPase de membrana plasmática em raízes e caules de uma variedade de arroz resistente ao sal. Esses autores observaram que a maior expressão dos genes nas raízes se correlacionava com um melhor controle na absorção e acúmulo dos íons Na⁺ e Cl⁻,

refletindo-se nas baixas concentrações desses íons nos caules, onde a expressão dos genes da H^+ -ATPase não é significativamente aumentada.

De acordo com diversos autores, um outro mecanismo para regulação da atividade das H^+ -ATPases se dá através de mudanças na composição lipídica da membrana celular, alterando a conformação tridimensional das enzimas para formas mais eficientes no acoplamento da hidrólise do ATP ao transporte de prótons (DOUGLAS & WALKER, 1984; WU & SELISKAR, 1998).

4.6. Peroxidação dos lipídios de membrana plasmática

Os efeitos da salinidade sobre a peroxidação dos lipídios de vesículas enriquecidas de membrana plasmática de raízes dos clones de cajueiro anão-precoce são apresentados na Figura 17. Como observado, o teor de malondialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação dos lipídios (FU & HUANG, 2001), foi alterado significativamente pelo estresse salino apenas no clone sensível (CCP 06), com um aumento de 56% em relação ao controle. Esses resultados sugerem que as raízes do clone BRS 189 (tolerante) possuem um sistema antioxidativo mais eficiente do que aquele do clone CCP 06 (sensível). Isto resultaria na remoção das espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pela salinidade. Por outro lado, o maior acúmulo de prolina e N-aminossolúveis, observado nas raízes deste clone (BRS 189) quando ele foi cultivado sob condições de estresse salino (Figura 14) pode também ter contribuído para a remoção de ROS e proteção da membrana plasmática, pois, além da função osmorreguladora, esses solutos têm também função protetora (CHEN & MURATA, 2002; WANG *et al.*, 2003).

É difícil precisar se o aumento nos teores de lipídios peroxidados foi o fator determinante para que a atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática das raízes do clone

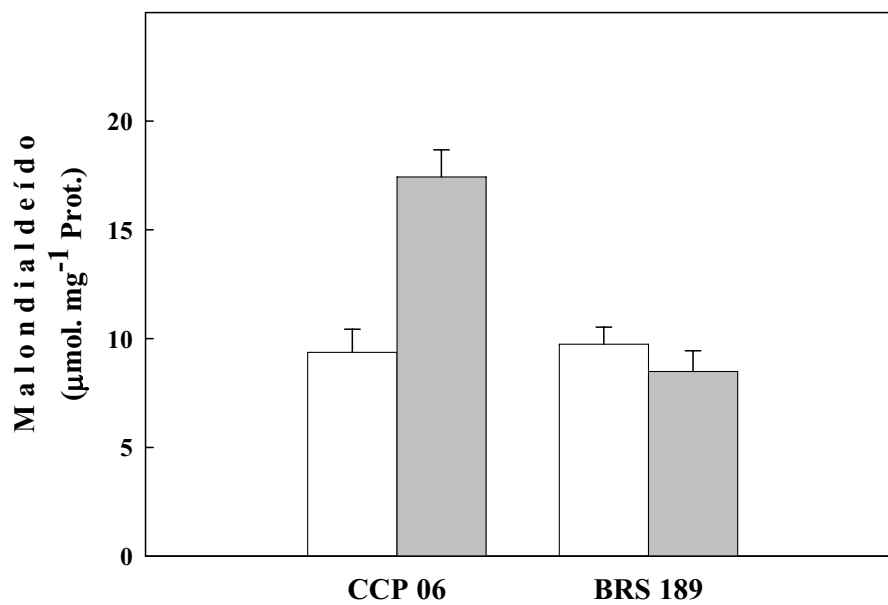


Figura 17. Teores de malondialdeído da fração membrana isolada de raízes de plântulas dos clones CCP 06 (sensível) e BRS 189 (tolerante) de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (\square) e de estresse salino (NaCl) a 8 dS.m^{-1} de condutividade elétrica (\blacksquare). As barras representam o desvio padrão.

CCP 06 não tenha aumentado sob condições de estresse salino. Segundo Yang *et al.* (2004), a inativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática de raízes de cultivares de trigo sensíveis ao estresse salino deveu-se à oxidação direta dos grupos SH da cisteína, essenciais para a atividade dessa enzima, e não à peroxidação dos lipídios de membrana. Portanto, segundo esses autores a peroxidação dos lipídios é simplesmente um indicador de estresse oxidativo, não estando envolvida na inativação das H⁺-ATPases de membrana plasmática.

4.7. Lipídios de membrana plasmática

4.7.1. Esteróis e fosfolipídios totais

Na Tabela 1 são apresentados os teores de fosfolipídios totais (PLt) e esteróis totais (Et), bem como os valores da relação PLt/Et dos clones BRS 189 (tolerante) e CCP 06 (sensível), sob condições controle e de estresse salino (NaCl a 8 dS.m⁻¹). No controle, foram pequenas as diferenças nos teores dos PLt dos dois clones, porém o teor em Et do BRS 189 foi 229% maior do que aquele do CCP 06. Sob condições de salinidade, o clone CCP 06 mostrou uma redução de 20,5% no teor de PLt, em relação ao controle, e um aumento de 64,3% no teor de Et, sendo nesse clone observado uma redução na relação PLt/Et de 51,6%. No clone BRS 189, a salinidade teve pouco efeito nos teores de PLt, embora tenha diminuído o teor de Et em 21,7%, em relação ao controle. Em função disso, a relação PLt/Et nesse clone aumentou em 38,6%, em relação ao controle. É interessante observar que, em condições controle, o BRS 189 apresentou uma relação PLt/Et 74,5% menor do que a do CCP 06, porém, sob condições de salinidade essa relação foi apenas 28,2% menor do que aquela do CCP 06.

Tabela 1. Teores de fosfolipídios totais (PLt) e de esteróis totais (Et) e relação PLt/Et da fração membrana isolada de raízes de plântulas dos clones CCP 06 (sensível) e BRS 189 (tolerante), sob condições controle e de estresse salino (NaCl) a 8 dS.m⁻¹ de condutividade elétrica.

Clone	Tratamento	PLt	Et	PLt/Et
		($\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{Prot}$)	($\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{Prot}$)	($\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)
CCP 06	Controle	0,39	0,14	2,79
	Salino	0,31	0,23	1,35
BRS 189	Controle	0,32	0,46	0,70
	Salino	0,35	0,31	0,97

Alguns autores relacionam um alto teor de Et ou uma baixa relação PLt/Et com uma característica de tolerância à salinidade, tanto em halófitas quanto em glicófitas (WU *et al.* 1998), uma vez que os esteróis são efetivos na regulação da estabilidade e permeabilidade das membranas aos íons (MANSOUR *et al.*, 1994). Os resultados aqui apresentados concordam com tais observações, pois o clone mais tolerante, o BRS 189, foi o que apresentou maior teor de Et e menor relação PLt/Et tanto em condições controle quanto de estresse salino (Tabela 1).

O fato do BRS 189 ter apresentado o maior conteúdo em Et e ter sido o que aumentou a atividade da H⁺-ATPase sob condições de estresse salino (Figura 16), pode explicar sua maior eficiência na regulação do sódio para a parte aérea (Figura 10). Em apoio a esta idéia, Douglas & Walker (1984) observaram que o aumento nos esteróis da membrana plasmática de raízes de cultivares de *Citrus* reduz sua permeabilidade aos íons cloreto, conferindo tolerância ao estresse salino. Essa redução na permeabilidade foi atribuída a um maior aumento no conteúdo de esteróis de estrutura mais planar (estigmasterol e campesterol) em relação aos esteróis menos planares (colesterol e sitosterol) (DOUGLAS & WALKER, 1983).

4.7.2. Composição dos fosfolipídios

Na tentativa de elucidar o aumento em atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática de raízes do clone BRS 189 pela salinidade (Figura 16), procedeu-se a uma análise na composição dos fosfolipídios presentes nas membranas. A realização dessa análise teve por base o fato de que alguns fosfolipídios parecem estar envolvidos na regulação da atividade da H⁺-ATPase, embora os resultados sejam controversos (PALMGREN *et al.*, 1988; PALMGREN & SOMMARIN, 1989 ; GRANDMOUGIN-FERJANI *et al.*, 1997; KERKEB *et al.* 2001; KASAMO, 2003). Para isso, a fração lipídica

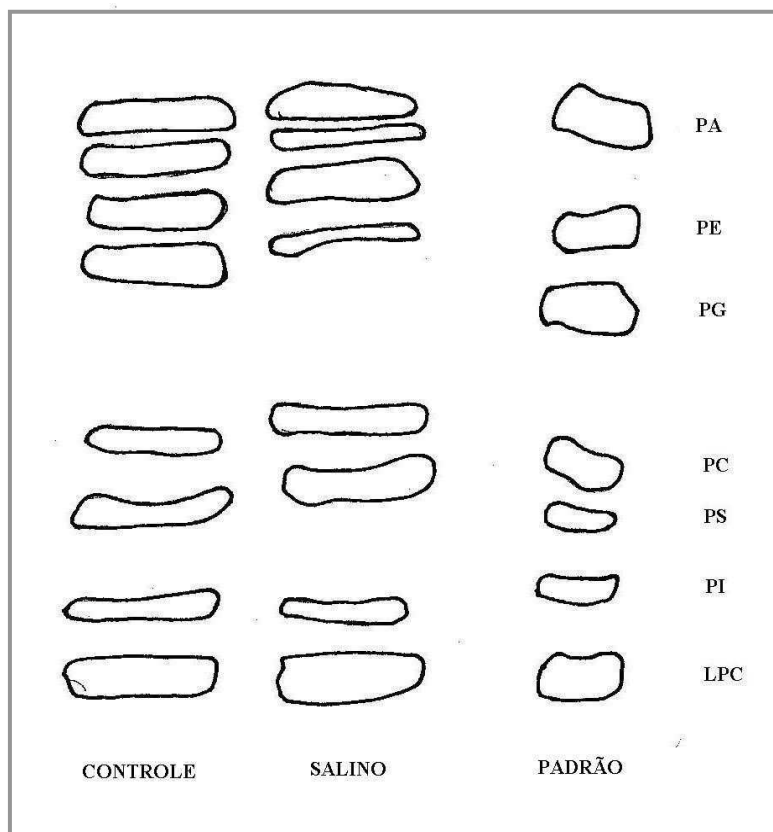


Figura 18. Cromatografia em camada delgada dos fosfolipídios de frações enriquecidas de membrana plasmática isolada de raízes de plântulas do clone BRS 189 (tolerante) de cajueiro anão-precoce, sob condições controle e de estresse salino (NaCl) a 8 dS.m^{-1} de condutividade elétrica. Os padrões de fosfolipídios utilizados foram: LPC – lisofosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PS – fosfatidilserina; PC – fosfatidilcolina; PG – fosfatidilglicerol; PE – fosfatidiletanolamina e PA – ácido fosfatídico.

total de membrana plasmática desse clone foi fracionada por cromatografia de camada delgada (CCD) nas suas diversas classes lipídicas, sendo os fosfolipídios identificados por comparação com um padrão formado pelos principais fosfolipídios. Como observado na Figura 18, a CCD revelou a presença dos fosfolipídios lisofosfatidilcolina (LPC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) e ácido fosfatídico (PA). Também, observou-se uma banda na placa cromatográfica, situada entre PE e PA, que, após análise de fósforo, comprovou-se tratar-se de um fosfolipídio desconhecido (X). Essa composição em fosfolipídios foi a mesma para ambos os tratamentos, fato que demonstra que o estresse salino não foi capaz de induzir modificações qualitativas nas diversas classes de fosfolipídios analisados.

A composição percentual dos oito fosfolipídios extraídos da placa de CCD é mostrada na Figura 19. Em condições controle, os principais fosfolipídios presentes na membrana plasmática das raízes do clone BRS 189 foram PG, PE, PS e X, que se apresentaram nas proporções de 21,7, 18,5, 16,3 e 16,3%, respectivamente, em relação ao total. Os principais fosfolipídios presentes nas membranas plasmáticas de raízes de dicotiledôneas não lenhosas são PC, PE e PG (SANDSTROM & CLELAND, 1989; MANSOUR *et al.*, 1994; KERKEB *et al.* 2001) não havendo, contudo, informações sobre a composição desses lipídios em árvores frutíferas.

A salinidade provocou alterações nas proporções relativas dos fosfolipídios, sendo PE e PI os que apresentaram maiores aumentos (em média 84%), enquanto que PG e PA foram os que apresentaram maiores reduções, 78 e 44,8% respectivamente. A percentagem de PS, em relação ao total, não foi afetada pela salinidade, enquanto que a de X apresentou um aumento de 28,6% e as de LPC e PC foram reduzidas de 25,7 e 15,2%, respectivamente (Figura 19).

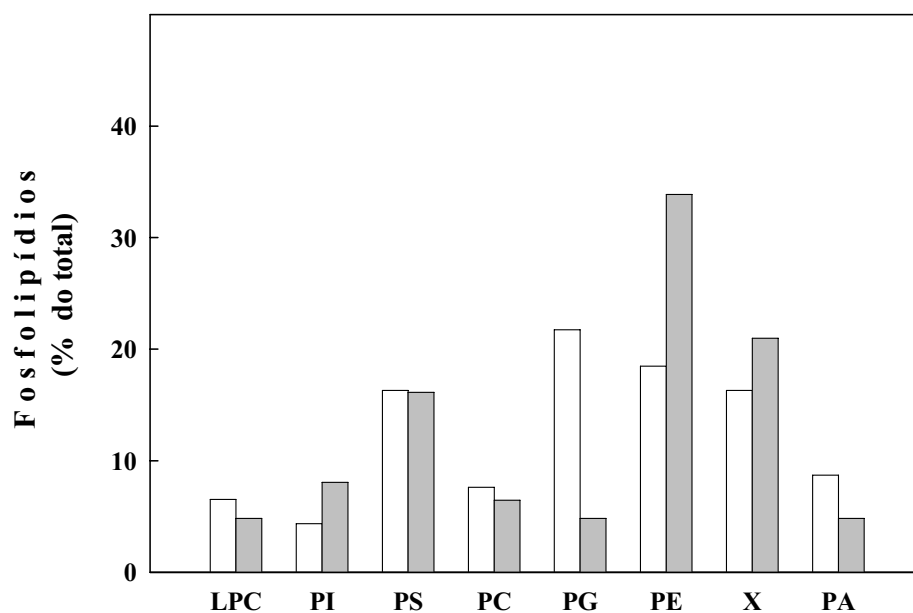


Figura 19. Composição de fosfolipídios da fração membrana isolada de raízes de plântulas do clone BRS 189 (tolerante) de cajueiro anão-precoce, sob condições controle (□) e de estresse salino (NaCl) a 8 dS.m^{-1} de condutividade elétrica (■). LPC – lisofosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; PS – fosfatidilserina; PC – fosfatidilcolina; PG – fosfatidilglicerol; PE – fosfatidiletanolamina; X – fosfolípido desconhecido e PA – ácido fosfatídico.

Serrano *et al.* (1988) citado por Sandstrom & Cleland (1989), observaram que os altos níveis de PE, nas membranas plasmáticas de raízes de aveia se correlacionavam com os elevados valores em atividade da H⁺-ATPase. É possível que o aumento em PE, em relação aos outros fosfolipídios, observado nas membranas plasmáticas do BRS 189, sob condições de estresse salino, seja responsável pelo estímulo na atividade da H⁺-ATPase (Figura 16). Esse fato reforça a hipótese acima mencionada.

5. CONCLUSÕES

- A salinidade inibiu o crescimento das plântulas dos cinco clones de cajueiro anão-precoce, sem alterar o estado hídrico das mesmas. Desses clones, o clone CCP 06 foi o que apresentou maior redução no crescimento, sob condições de estresse salino, enquanto o BRS 189 foi o que apresentou menor redução;
- A redução na fotossíntese líquida, induzida pela salinidade, correlacionou-se com o acúmulo dos íons Na^+ e Cl^- nas folhas. A manutenção na concentração interna de CO_2 , durante o estresse salino, sustenta a idéia de que essa redução não foi provocada pelo fechamento dos estômatos;
- Os clones, BRS 189 e CCP 09 regularam o transporte dos íons Na^+ e Cl^- para a parte aérea da planta, acumulando-os nas raízes. O maior acúmulo desses íons na parte aérea do clone CCP 06, correlaciona-se com o maior declínio em sua fotossíntese líquida;
- O aumento na atividade da H^+ -ATPase e o alto teor de esteróis totais nas membranas plasmáticas das raízes do clone BRS 189 (não observado no CCP 06) foram concordantes com a maior capacidade desse clone de excluir os íons tóxicos, Na^+ e Cl^- , da parte aérea;
- O clone BRS 189 mostrou maior proteção que o CCP 06 contra o dano oxidativo, gerado pela salinidade, nas membranas plasmáticas isoladas de raízes;
- Os estudos sobre as características fisiológicas e bioquímicas das plântulas dos clones de cajueiro anão-precoce mostraram que o clone BRS 189 apresentou melhor resposta às condições de estresse salino do que o clone CCP 06.

6. LITERATURA CITADA

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

ALLAKHVERDIEV, S. I.; SAKAMOTO, A.; NISHIYAMA, Y.; INABA, M.; MURATA, N. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1047-1056, 2000.

ALMEIDA, T. D. **Mobilização de reservas cotiledonares para folhas de plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino.** Fortaleza, Ce: UFC, 2003. Originalmente apresentada como monografia de graduação, Universidade Federal do Ceará.

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

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

ARANGO, M.; GÉVAUDANT, F.; OUTFATTOLE, M.; BOUTRY, M. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. **Planta**, v. 216, p. 355-365, 2003.

ARBONA, V.; FLORS, V.; JACAS, J.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; GÓMES-CARDENAS, A. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p. 388-394, 2003.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASHCROFT, R. G.; COSTER, H. G. L.; LAVER, D. R.; SMITH, J. R. The effects of cholesterol inclusion on the molecular organisation of bimolecular lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 730, p. 231-238, 1983.

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

BAILEY, L. H. **Manual of cultivated plants**. New York: S.I., 1964.

BALL, M. C.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. Salinity-induced potassium deficiency causes loss of functional photosystem II in leaves of the gray mangrove, *Avicennia marina*, through depletion of the atrazine-binding polypeptide. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 351-361, 1987.

BALLESTEROS, E.; KERKEB, B.; DONAIRE, J. P.; BELVER, A. Effects of salt stress on H⁺-ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles isolated from sunflower roots. **Plant Science**, v. 134, p. 181-190, 1998.

BAÑULUS, 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.

BARROS, L.; PIMENTEL, C. R. M., CORREA, M. P. F., MESQUITA, A. L. M. *Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão-precoce*. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 1993, 65 p.

BARRS, H. D. Determination of water deficits in plant tissue. In: Kozlowsky T. T. (ed.). **Water deficits and plant growth**. New York: Academic Press Inc., v. 1, 1968, p. 235-368.

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.

BAXTER, I.; TCHIEU, J.; SUSSMAN, M.R.; BOUTRY, M.; PALMGREN, M. G.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J. F.; AXELSEN, K. B. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. **Plant Physiology**, v. 132, p.618-628, 2003.

BEN-HAYYIM, G.; RAN, U. Salt-induced cooperativity in ATPase activity of plasma membrane-enriched fractions from cultured *Citrus* cells: kinetic evidence. **Physiologia Plantarum**, v. 80, p. 210-216, 1990.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. 1^a ed. Jacoticabal: FUNEP, 1988.

BINZEL M.; HESS F.; BRESSAN R.; HASEGAWA P. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. **Plant Physiology**, v. 86, p. 607-614, 1988.

BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BLITS, K. C.; GALLAGHER, J. L. Effect of NaCl on lipid content of plasma membranes of the dicot halophyte *Kosteletzkya virginica* L. **Plant Cell Report**, v. 9, p. 156-159, 1990.

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. Adaptation to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1099-1111, 1995.

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

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3^a ed. Mossoró: Escola superior de agricultura de Mossoró, 1976, 510 p.

BRAUN Y.; HASSIDIM M.; LERNER H.; REINHOLD L. Studies on H⁺-translocating ATPase in plants of varying resistance to salinity. **Plant Physiology**, v. 81, p. 1050-1056, 1986.

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: Americam Society of Plant Physiologist, 2000, p.1158-1203.

BRISKIN, D. P. Solute transport across plant cell membrane: Biochemical and Biophysical Aspects. In: Pessaraki, M. (ed.). **Handbook of plant and crop physiology**. Arizona: Marcel Dekker, Inc., 1995, p. 387-418.

BRUGNOLI, E.; LAUTERI, M. Effects of salinity on stomatal conductance, photosintetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt tolerant (*Gossypium hirsitum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C₃ non-halophytes. **Plant Physiology**, v. 95, p. 628-635, 1991.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzimology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

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.

CARTER, D. L. Problems of salinity in agriculture. In: Poljakoff-Mayber, A.; Gale, J. (eds.). **Plants in saline environment**. New York: Springer-Verlag, 1975, p. 25-35.

CAVALCANTE JUNIOR, A. T.; MATOS, N. N.; SILVEIRA, J. A. G. Comportamento estomático do porta-enxerto CCP 06 e da muda enxertada CCP 76/06, submetidos aos estresses hídrico e salino. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003, 14 p.

CHAPMAN K. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. **Trends in plant science**, v. 3, p. 419-425, 1998.

CHARTZOULAKIS, K. S. Salinity and olive: Growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. **Agriculture Water Management**, v. 78, p. 108-121, 2005.

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.

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

CHEN, S.; LI, J.; FRITZ, E.; WANG, S.; HÜTTERMANN, A. Sodium and chloride distribution in roots and transport in three poplar genotypes under increasing NaCl stress. **Forest Ecology and Management**, v. 168, p. 217-230, 2002.

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.

COOKE, D. T.; BURDEN, R. S. Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. **Physiologia Plantarum**, v. 78, p. 153-159, 1990.

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

CRISÓSTOMO, L. A.; SANTOS, F. J.; OLIVEIRA, V. H.; RAIJ, B.; BERNARDI, A. C.; SILVA, C. A.; SOARES, I. Cultivo do cajueiro anão precoce: Aspectos fitotécnicos com ênfase na adubação e na irrigação. Fortaleza: Embrapa/Agroindústria Tropical, Circular técnica N° 08, 2001, 20 p.

DITTMER, J. C.; WELLS, M. A. Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components. **Methods in Enzimology**, v. 14, p. 482-530, 1969.

DOUGLAS, T. J.; WALKER, R. R. 4-Desmethylsterol composition of citrus rootstocks of different salt exclusion capacity. **Physiologia Plantarum**, v. 58, p. 69-74, 1983.

DOUGLAS, T. J.; WALKER, R. R. Phospholipids, free sterols and adenosine triphosphatase of plasma membrane-enriched preparations from roots of citrus genotypes differing in chloride exclusion ability. **Physiologia Plantarum**, v. 62, p. 51-58, 1984.

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.

EBERT G.; ALI-DINAR H.M.; LÜDDERS P. **Fruit production in salinity affected areas:causes, consequences and possible solutions**. Hohenheim: Tropentag, 1997, p.77-81.

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

EL-BAKY, A.; HANAA, H.; AMAL, M. A.; HUSSEIN, M. M. Influence of salinity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and electrophoretic patterns of protein and isoenzymes in leaves of some onion cultivars. **Asian Journal of Plant Science**, v. 2, p. 1220-1227, 2003.

EPSTEIN, E; RAINS, D. W.; ELZAM, O. E. Resolution of dual mechanism of potassium absorption by barley roots. **PNAS**, v. 49, p. 684-692, 1963.

FERRÃO, J. E. M. **O cajueiro**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1995, 299 p.

FERREIRA, R. G.; TÁVORA, F. J. A. F.; FERREYRA, F. F. Distribuição da matéria seca e composição química das raízes, caule e folhas de goiabeira submetida a estresse salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 79-88, 2001.

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

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 in Plant Physiology**, v. 28, p. 89-121, 1977.

FU, J.; HUANG, B. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptations of two cool-seasons grasses to localized drought stress. **Environment and Experimental Botany**, v. 45, p. 105-114, 2001.

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.

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

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.

GAXIOLA, R.; RAO, R.; SHERMAN, A.; GRISAFI, P.; ALPER, S.; FINK, G. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. **PNAS**, v. 96, p. 1480-1485, 1999.

GEBAUER, J.; EI-SIDDIG, K.; SALIH, A. A.; EBERT, G. *Tamarindus indica* L. seedlings are moderately salt tolerant when exposed to NaCl-induced salinity. **Scientia Horticulture**, v. 103, p. 1-8, 2004.

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

GOSSETT, D. R.; MILLHOLLON, E. P.; LUCAS, M. C.; BANKS, S. W.; MARNEY, M. M. The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Report**, v. 13, p. 498-503, 1994.

GRANDMOUGIN-FERJANI, A.; SCHULER-MULLER, I.; HARTMANN, M. Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. **Plant Physiology**, v. 113, p. 163-174, 1997.

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. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.

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

HAO, F.; WANG, X.; CHEN, J. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. **Plant Science**, v. 170, p. 151-158, 2006.

HIRSCH, R. E.; SUSSMAN, M. R. Improving nutrient capture from soil by the genetic manipulation of crop plants. **TIBTECH**, v. 17, p. 356-361, 1999.

HODGES, D. M.; DeLONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plants tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604-611, 1999.

HODGES, T. K.; LEONARD, R. T.; BRACKER, C. E.; KEENAN, T. W. Purification of ion-stimulated adenosine triphosphatase from plant roots: Association with plasma membrane. **PNAS**, v. 69, p. 3307-3311, 1972.

HSIAO, T. C.; XU, L. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1595-1616, 2000.

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

IPECE. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará. Ceará em Números 2005. Agropecuária. 2006. Disponível em: <http://www.IPECE.ce.gov.br>.

ISHITANI, M.; LIU, J.; HALFTER, U.; KIM, CH.; SHI, W.; ZHU, J. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1667-1677, 2000.

KAISER, W. M. Effects of water deficits on photosynthetic capacity. **Physiologia Plantarum**, v. 71, p. 142-149, 1987.

KASAMO K. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity by the membrane environment. **Journal Plant Research**, v. 116, p. 517-523, 2003.

KERKEB, L.; DONAIRE, J. P.; VENEMA, K.; RODRIGUEZ-ROSALES, M. P. Tolerance to NaCl induces changes in plasma membrane lipid composition, fluidity and H⁺-ATPase activity of tomato calli. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 217-224, 2001.

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

KÜHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-Type ATPases. **Nature Reviews**, v. 5, p. 282-295, 2004.

KUIPER, P. J. C. Environmental changes and lipid metabolism of higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 64, p. 118-122, 1985.

LEONARD, R. T.; HANSEN, D., HODGES, T. K. Membrane-bound adenosine triphosphatase activities of oat roots. **Plant Physiology**, v. 51, p. 749-754, 1973.

LEPAGE, M. Identification and composition of turnip root lipids. **Lipides**, v. 2, p. 244-250, 1967.

LIMA, V. P. M. S. **Cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 1988, 486 p.

LLOYD, J.; KRIEDEMANN, P. E.; ASPINALL, D. Contrast between *Citrus* species in response to salinisation: an analysis of photosynthesis and water relations for different rootstock-scion combination. **Physiologia Plantarum**, v. 78, p. 236-246, 1990.

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

MAAS, E. V. Plant response to soil salinity. In: Promaco Conventions PTY LTD (eds). **Productive use and rehabilitation of saline lands**. Albany: 1996, p. 385-391.

MA, T.; LIU, Q.; LI, Z.; ZHANG, X. Tonoplast H⁺-ATPase in response to salt stress in *Populus euphratica* cell suspensions. **Plant Science**, v. 163, p. 499-505, 2002.

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.

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.

MANSOUR, M. M. F.; VAN HASSELT, P. R.; KUIPER, P. J. C. Plasma membrane lipid alterations induced by NaCl in winter wheat roots. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 473-478, 1994.

MARCELIS, L. F. M.; Van HOOIJDONK, J. Effect of salinity on growth, water use and nutrient use in radish (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 215, p. 57-64, 1999.

MASSAI, R.; REMORINI, D.; TATTINI, M. Gas exchange, water relations and osmotic adjustment in two scion/rootstock combinations of *Prunus* under various salinity concentrations. **Plant and Soil**, v. 259, p.153-162, 2004.

McKERSIE, B. D.; LESHEM, Y. Y. **Stress and Stress coping in cultivated plants**. Netherlands: Kluwers Academic Publishers, 1994, 256 p.

MELONI, D. A.; OLIVA, M. A.; MARTINEZ, C.A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 69-76, 2003.

MICHELET, B.; BOUTRY, M. The plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1-6, 1995.

MITCHELL, J. D.; MORI, S. A. The cashew and its relatives (*Anacardium occidentale*). **Memor. of the New York Botanical garden**, New York, v. 42, p. 1-76, 1987.

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.

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1465, 1-16, 2000.

MOYA, J. L.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, p. 1425-1433, 1999.

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

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

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.

OERTLI, J. J. Extracellular salt accumulation: a possible mechanism of salt injury in plants. **Agrochimica**, v. 12, p. 461-469, 1968.

O'LEARY, J.W. The role of halophytes in irrigated agriculture. In: Staples, R.C. and Toenniessen, G.H. (eds.). **Salinity tolerance in plants: Strategies for crop improvement**. New York: John Wiley & Sons, 1984, p. 285-300.

OLIVEIRA, V. **Cultivo do cajueiro anão-precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical/CNPAT, 2002, 40 p.

OTTOW, E. A.; BRINKER, M.; TEICHMANN, T.; FRITZ, E.; KAISER, W.; BROSCHE, M.; KANGASJÄRVI, J.; JIANG, X.; POLLE, A. *Populus euphratica* displays apoplastic sodium accumulation, osmotic adjustment by decreases in calcium and soluble carbohydrates, and develops leaf succulence under salt stress. **Plant Physiology**, v. 139, p. 1762-1772, 2005.

PALMGREN, M. G. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 817-845, 2001.

PALMGREN, M. G.; CHRISTENSEN, G. Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 3027-3033, 1994.

PALMGREN, M. G.; LARSSON, C.; SOMMARIN, M. Proteolytic activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by removal of a terminal segment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 13423-13426, 1990.

PALMGREN, M.; SOMMARIN, M. Lysophosphatidilcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1009-1014, 1989.

PALMGREN, M.; SOMMARIN, M.; ULVSKOV, P.; JØRGENSEN P. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A₂. **Physiologia Plantarum**, v. 74, p. 11-19, 1988.

PARANYCHIANAKIS, N. V.; CHARTZOULAKIS, K. S. Irrigation of mediterranean crops with saline water: from physiology to management practices. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 106, p. 171-187, 2005.

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 salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees**, v. 18, p. 167-174, 2004.

PAULA PESSOA, P.; LEITE, L.; PIMENTEL, C. Situação atual e perspectivas da agroindústria do caju. In: Araujo, J.P.P.; Silva, V.V. Coord. (eds.). **Cajucultura: Modernas técnicas de produção**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1995, p. 23-42.

PEDCHENKO, V.; NASIROVA, G.; PALLADINA T. Lysophosphatidylcholine specifically stimulates plasma membrane H⁺-ATPase from corn roots. **FEBS Lett**, v. 275, No 1,2, p. 205-208, 1990.

PEIXOTO, A. Caju. Produtos rurais, Rio de Janeiro, v. 13, p 1-61, 1960.

PLAUT, Z. Photosynthesis in plant/crops under water and salt stress. In: Mohammad Pessaraki (eds), **Handbook of Plant and Crop Physiology. Handbook of plant and crop physiology**. Arizona: Marcel Dekker, Inc., 1995, p. 587-603.

PORTILLO, F. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 31-42, 2000.

QUAIL, P. H. Plant Cell fractionation. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 30, p. 425-484, 1979.

QUARTACCI, M. F.; GLISIC, O.; STEVANOVIC, B.; NAVARRI-IZZO, F. Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2159-2166, 2002.

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

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

RHODES, D.; HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 357-384, 1993.

RIVEIRO, R. M.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Role of grafting in horticultural plants under stress conditions. **Food, Agriculture and Environment**, v. 1, p. 70-74, 2003.

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

RODRIGUEZ-ROSALES, M. P.; KERKEB, L.; BUENO, P.; DONAIRE, J. P. Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase and antioxidant enzymes activities of tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) calli. **Plant Science**, v. 143, p. 143-150, 1999.

RUBIO, F.; GASSMANN, W.; SCHROEDER, J. I. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. **Science**, v. 270, p. 1660-1663, 1995.

RYU, S. Phospholipid-derived signalling mediated by phospholipase A in plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, No 5, p. 229-235, 2004.

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

SALISBURY F., ROSS C. **Plant Physiology**. Fourth edition. California: Wadsworth Publishing Company, 1992, 682 p.

SANDSTROM, R. P.; CLELAND, R. E. Comparison of the lipid composition of oat root and coleoptile plasma membrane. **Plant Physiology**, v. 90, 1207-1213, 1989.

SCARBOROUGH, G. A. Rethinking the P-type ATPase problem. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 581-584, 2003.

SCHACHTMAN, D. P.; TYERMAN, S. D.; TERRY, B. R. The K^+/Na^+ selectivity of a cation channel in the plasma membrane of root cells does not differ in the salt-tolerant and salt-sensitive wheat species. **Plant Physiology**, v. 97, 598-605, 1991.

SERRANO, R.; MULET, J. M.; RIOS, G.; MARQUEZ, J. A.; LARRINOA, I. F.; LEUBE, M. P.; MENDIZABAL, I.; PASCUAL-AHUIR, A.; PROFT, M.; ROS, R.; MONTESINOS, C. A glimpse of the mechanism of ion homeostasis during salt stress. **Journal Experimental Botany**, v. 50, p. 1023-1036, 1999.

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

SHI, H.; ISHITANI, M.; KIM, CH.; ZHU, J. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. **PNAS**, v. 97, p. 6896-6901, 2000.

SILVA, S. L. F. **Transpiração e partição de Na^+ e Cl^- em mudas e porta-enxertos de diferentes genótipos de cajueiro anão-precoce submetidos ao estresse salino**. Fortaleza, Ceará: UFC, 2004. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Fitotecnia), Universidade Federal do Ceará.

SINENSKY, M.; PINKERTON, F.; SUTHERLAND, E.; SIMON, F. R. Rate limitation of $(Na^+ + K^+)$ -stimulated adenosinetriphosphatase by membrane acyl chain ordering. **PNAS**, v. 76, p. 4893-4897, 1979.

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

SKIPSKI, V. P.; BARCLAY, M. Thin-layer chromatography of lipids. **Methods in Enzimology**, v. 14, p. 530-598, 1969.

SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREM, M. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, v. 136, p. 2475-2482, 2004.

STOREY, R.; WALKER, R. R. Citrus and Salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 39-81, 1999.

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

SUHAYDA, C. G.; GIANNINI, J. L.; BRISKIN, D. P.; SHANNON, M. C. Electrostatic changes in *Lycopersicon esculentum* root plasma membrane resulting from salt stress. **Plant Physiology**, v. 93, p. 471-478, 1990.

SURJUS, A.; DURAND, M. Lipid changes in soybean root membranes in response to salt treatment. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 17-23, 1996.

SZE, H.; LI, X.; PALMGREM, M. Energization of plant cell membranes by H⁺- pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 11, p. 677-689, 1999.

SZE, H. H⁺- Translocating ATPases: Advances using Membrane Vesicles. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 36, p. 175-208, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Third edition. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2002, 690 p.

TALEISNIK, E.; GRUNBERG, K. Ion balance in tomato cultivars differing in salt tolerance. I. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 528-534, 1994.

TATTINI, M.; GUCCI, R.; CORADESC, 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.

TÁVORA, F. J. A. F., LIMA, E. C. C., FERREIRA, F. F. Composição mineral das raízes, caules e folhas em plantas jovens de graviola submetidas a estresse salino. **Revista Ciência Agonômica**, v. 35, n.1, p. 44-51, 2004.

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

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

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.

WASEL, R. B.; ESHEL, A.; AGAMI, M. Salt balance of leaves of the mangrove *Avicennia marina*. **Physiologia Plantarum**, v. 67, p. 67-72, 1986.

WAISEL, Y. Sources of salinity. In: **Biology of Halophytes**. New York: Academic Press, Inc., 1972, p. 1-12.

WATAD, A. A.; REUVENI, M.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Enhanced net K⁺ uptake capacity of NaCl-adapted cells. **Plant Physiology**, v. 95, p. 1265-1269, 1991.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant response to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

WU, J. SELISKAR, D. M. Salinity adaptation of plasma membrane H⁺-ATPase in the salt marsh plant *Spartina patens*: ATP hydrolysis and enzyme kinetics. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1005-1013, 1998.

WU, J.; SELISKAR, D. M.; GALLAGHER, J. L. Stress tolerance in the marsh plant *Spartina patens*: Impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition. **Physiologia Plantarum**, v. 102, p. 307-317, 1998.

YAN, F.; FEUERLE, R.; SCHÄFFER, S.; FORTMEIER, H.; SHUBERT, S. Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. **Plant Physiology**, v. 117, p. 311-319, 1998.

YANG, Y. L.; GUO, J. K.; ZHANG, F.; ZHAO, L. Q.; ZHANG, L. X. NaCl induced changes of the H⁺-ATPase in root plasma membrane of two wheat cultivars. **Plant Science**, v. 166, p. 913-918, 2004.

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.

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

YOKOI, S.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA P. M. Salt stress tolerance of plants. **JIRCAS Working Report**, p. 25-33, 2002.

ZHANG, J. S.; XIE, C.; LI, S. Y. Expression of the plasma membrane H⁺-ATPase gene in response to salt stress in a rice salt-tolerant mutant and its original variety. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 1006-1011, 1999.

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

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

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.

ZWIAZEK, J. J.; BLAKE, T. J. Effects of preconditioning on electrolyte leakage and lipid composition in black spruce (*Picea mariana*) stressed with polyethylene glycol. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 71-77, 1990.