

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

VALDINÉIA SOARES FREITAS

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS RELACIONADOS COM A
TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM ALGODÃO, FEIJÃO-DE-CORDA E SORGO**

FORTALEZA

2010

VALDINÉIA SOARES FREITAS

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS RELACIONADOS COM A
TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM ALGODÃO, FEIJÃO-DE-CORDA E SORGO**

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

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: *Prof. Dr. Enéas Gomes Filho*

Co-orientador: *Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda*

FORTALEZA

2010

F938a Freitas, Valdinéia Soares

Aspectos fisiológicos e bioquímicos relacionados com a tolerância à salinidade em algodão, feijão-de-corda e sorgo / Valdinéia Soares Freitas, 2010.

95 f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2010.

1.Enzimas antioxidativas. 2. Algodão. 3. Feijão-de-corda. 4. Sorgo. I. Gomes Filho, Enéas (Orient.). II. Lacerda, Claudivan Feitosa de (Co-orient.). III. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III.Título.

CDD 574.192

VALDINÉIA SOARES FREITAS

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS RELACIONADOS COM A
TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM ALGODÃO, FEIJÃO-DE-CORDA E SORGO**

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

Aprovada em: 09 de março de 2010

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a. Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão
Universidade Estadual do Ceará - UECE

FORTALEZA-CE

2010

A minha família

Dedico

*“O Senhor é meu pastor, nada me faltará.
Em verdes prados ele me faz repousar.
Conduz-me junto às águas refrescantes,
restaura as forças de minha alma.
Pelos caminhos retos ele me leva,
por amor do seu nome.”*

Salmos 23

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, sem o qual nada seria possível. Obrigado **Senhor**, pois sei que ilumina meu caminho e guia meus passos.

A **Nossa Senhora**, minha santa mãe intercessora, que não me desampara nos momentos de angústias.

Aos meus pais, Fátima Soares Freitas e Valdemir Gomes Freitas, pela educação, incentivo, sabedoria e compreensão. AMO VOCÊS.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa a mim concedida, bem como pelo auxílio financeiro às pesquisas do Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Ao professor Enéas Gomes Filho pela orientação, amizade, confiança e incentivo à minha formação, bem como pela paciência a mim despendida nos últimos cinco anos.

Ao professor Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda pela co-orientação e a professora Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão pelas valiosas sugestões.

Ao professor Dr. José Hélio da Costa pelas experiências e ensinamentos compartilhados comigo.

Aos meus irmãos e sobrinhos.

A *Arilson de Carvalho Galvão*, que soube respeitar e compreender tantas ausências ao longo desta caminhada. Pelo seu amor e imensa paciência em tantos momentos de estresse.

Aos meus amigos e colegas componentes do grupo de Fisiologia Vegetal: Prof. Dr. José Tarquinio Prisco, Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho, Aiala Vieira Amorim, Alexandre Bosco de Oliveira, Alexcyane Rodrigues Feijão, Antônio Xavier de Oliveira Filho, Carlos Eduardo Braga de Abreu, Cibelle Gomes Gadelha, Elton Camelo Marques, Emanuelle Sampaio Almeida, Franklin Aragão Gondim, Jones Batista Vidal, Juan Carlos Alvarez Pizarro, Júlio César Barbosa da Silva, Michella de Albuquerque Lima, Michelle Aparecida Freitas de Andrade, Nara Lídia Mendes Alencar, Paulo André Ferreira de Freitas, Paulo Roberto Tomé de Sousa, Thalita Montoril Ferreira, Thiago Augusto Duarte de Menezes, Vivian Borba e Viviane Pinho de Oliveira, pelo auxílio nos experimentos, amizade e por tornarem os dias no laboratório mais agradáveis.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que direta ou indiretamente auxiliaram na minha formação científica.

Aos amigos que me auxiliaram na conquista desse objetivo. Em especial, Izabel Cristina da Silva, Ana Raquel Cardoso Nogueira e os colegas dos Cursos de Ciências Biológicas e Mestrado em Bioquímica da UFC.

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

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros fisiológicos e bioquímicos em três espécies vegetais com graus diferenciados de tolerância ao estresse salino, a fim de melhor entender suas diferenças na tolerância à salinidade. Para isto, sementes de algodão, feijão-de-corda e sorgo foram semeadas em copos plásticos contendo vermiculita umedecida com solução nutritiva de Hoagland ½ força (SNH ½), sendo o experimento conduzido em casa de vegetação. Plântulas de cinco dias de idade foram transferidas para meio hidropônico (SNH ½), onde permaneceram por um período de seis dias para aclimação. Após esse período, as plantas foram submetidas a três tratamentos salinos com valores de condutividade elétrica (CE) de 0,9 dS m⁻¹ (baixa salinidade), 4,0 dS m⁻¹ (média salinidade) e 8,0 dS m⁻¹ (alta salinidade). A coleta foi realizada aos 25 dias após o início do estresse. A salinidade reduziu significativamente a área foliar e a massa seca da parte aérea das três espécies estudadas, especialmente as das plantas de feijão-de-corda e em menor proporção as do algodão. O potencial osmótico de folhas e raízes das três espécies foram significativamente reduzidos nos tratamentos a 4,0 e 8,0 dS m⁻¹ em comparação com o de 0,9 dS m⁻¹, exceto nas raízes de sorgo. Já o teor relativo de água foliar não apresentou alterações com o aumento da CE do meio de crescimento. Os íons Na⁺ e Cl⁻ aumentaram nas folhas e raízes das três espécies, sendo que o algodão foi a espécie que mais reteve esses íons nos tratamentos a 4,0 e 8,0 dS m⁻¹. As concentrações de K⁺ nas folhas de algodão e feijão-de-corda foram aumentadas pelos níveis crescentes de salinidade, enquanto nas plantas de sorgo foram diminuídas. Já nas raízes as concentrações desse íon foram significativamente reduzidas nas três espécies. De maneira geral, nos tratamentos de média e alta salinidade comparados com o de baixa salinidade, as concentrações de NO₃⁻ foram reduzidas em folhas e raízes das três espécies. Os tratamentos a média e alta salinidade reduziram a concentração de carboidratos solúveis no algodão, enquanto aumentaram no feijão-de-corda e no sorgo. A concentração de proteína solúvel não se alterou no feijão-de-corda em função da salinidade, enquanto foi reduzida nas outras duas espécies. Os N-aminossólúveis foram aumentados nas três espécies, enquanto para a prolina, esses aumentos só foram observados a 8,0 dS m⁻¹. De modo geral, os parâmetros de emissão de fluorescência da clorofila *a* e a leitura SPAD não foram alterados pela salinidade. Os níveis de peroxidação lipídica foram significativamente aumentados nos tratamentos de média e alta salinidade no feijão-de-corda, não sofreram alteração no sorgo, enquanto foram reduzidos no algodão, quando comparados com o de baixa salinidade. A atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases do ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX)

em folhas, não foi alterada pelos tratamentos salinos a 4,0 e 8,0 dS m⁻¹, com exceção de reduções nas atividades da SOD e GPX no algodão e da CAT no feijão-corda e, aumentos para a GPX no sorgo. Nas raízes, foram observados aumentos para a SOD no algodão e aumentos para a GPX no sorgo e feijão-de-corda, enquanto houve reduções da APX e GPX para o algodão. Os dados de crescimento aqui apresentados confirmam a maior tolerância do algodão e a maior sensibilidade do feijão-de-corda ao estresse salino, enquanto que as alterações na peroxidação dos lipídios e nas enzimas antioxidativas nos levam a sugerir que o sistema enzimático antioxidativo do algodão parece ser mais eficiente do que o das outras duas espécies estudadas, na eliminação dos danos oxidativos ocasionados pela salinidade. É possível, também, que a maior capacidade do algodão de acumular íons tóxicos (Na⁺ e Cl⁻) nos tecidos fotossintetizantes contribua, pelo menos em parte, para sua maior tolerância à salinidade.

Palavras-chave: Tolerância à salinidade, enzimas antioxidativas, *Gossypium hirsutum*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor*, solutos orgânicos e inorgânicos, peroxidação de lipídios.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate physiological and biochemical parameters in three plant species with different degrees of salt tolerance in order to better understand their differences in salt tolerance. For this, cotton, cowpea and sorghum seeds were sown in plastic cups containing moistened vermiculite with Hoagland solution $\frac{1}{2}$ (HS $\frac{1}{2}$), which were maintained in greenhouse. Five days old seedlings were transferred to hydroponic medium (HS $\frac{1}{2}$), where they remained for six days in order to be acclimated. After this period, the plants were subjected to three saline treatments with electrical conductivity (EC) of 0.9 dS m⁻¹ (low salinity), 4.0 dS m⁻¹ (medium salinity) and 8.0 dS m⁻¹ (high salinity). The seedling harvest was carried out 25 days after the salt application. The salinity reduced leaf area and shoot dry mass of all species, especially of the cowpea plants. Medium and high levels of salinity reduced more the root dry mass of sorghum seedlings than low levels, while the dry mass shoot/root ratio of cowpea plants was not reduced in the same conditions. Leaf and root osmotic potential of the three species were significantly reduced in 4.0 and 8.0 dS m⁻¹ treatments compared to 0.9 dS m⁻¹, except in sorghum roots. The leaf relative water content did not change with EC increasing in the growing medium. Na⁺ and Cl⁻ concentrations increased in leaves and roots of these three species, especially in cotton at 4.0 and 8.0 dS m⁻¹. In cotton and cowpea leaves, the K⁺ concentration increased with the salt increment, while in the sorghum plants reduced. The root ion concentration was significantly reduced in all species. In general, medium and high salinity treatment reduced more NO₃⁻ concentrations in leaves and roots of all species than low salinity condition. In relation to leaf organic solutes, comparing the 4.0 and 8.0 dS m⁻¹ treatments with the 0.9 dS m⁻¹, it was observed that salinity reduced the soluble carbohydrate concentration in cotton, while in cowpea and sorghum this compound was increased. The soluble protein concentrations did not change in cowpea, whereas they were reduced in the other two species. The N-aminosolubles increased in the three species, while the proline contents increased only at 8.0 dS m⁻¹. The fluorescence emission parameters of chlorophyll *a* and SPAD showed unchanged with the NaCl increase in solution medium, except for cowpea plants, which caused an increment in relation to fluorescence variable/maximum and SPAD for 8.0 dS m⁻¹ treatment. The lipid peroxidation levels were significantly increased in cowpea, with the medium and high salinity treatment, whereas in sorghum they were not unchanged and in cotton they were reduced when compared with low salinity. The enzyme activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) in leaves was not

changed by saline treatments at 4.0 and 8.0 dS m⁻¹, except by reductions of SOD and GPX activities in cotton and CAT in cowpea, and GPX increase in sorghum. In roots, it was observed increases for SOD in cotton and GPX in sorghum and cowpea, on the other hand APX and GPX reductions were observed in cotton. The growth results obtained confirmed the highest cotton tolerance and the highest sensibility of the cowpea to salt stress, while the changes in antioxidant enzymes suggest that the constitutive antioxidant enzyme system of cotton seems to be more efficient than the other two species, in reduction of oxidative damage caused by salinity. It is also possible that the greater capacity of cotton to accumulate toxic ions (Na⁺ and Cl⁻) in photosynthetic tissues contributes, at least in part, to its greater tolerance to salinity.

Key-words: salt tolerance, antioxidant enzymes, *Gossypium hirsutum*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor*, organic and inorganic solutes and lipid peroxidation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Área foliar de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade..... 47
- Figura 2.** Massa seca da parte aérea, da raiz e relação entre massa seca da parte aérea e raiz de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade..... 49
- Figura 3.** Potencial osmótico em folhas e raízes e teor relativo de água foliar de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade..... 52
- Figura 4.** Fluorescência inicial, fluorescência máxima, relação entre a fluorescência variável e máxima e leitura SPAD em plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade..... 65
- Figura 5.** Conteúdo de malondialdeído em plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade..... 69
- Figura 6.** Atividade da dismutase do superóxido em folhas e raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade..... 71
- Figura 7.** Atividade da catalase em folhas e raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade..... 74
- Figura 8.** Atividade da peroxidase do ascorbato em folhas e raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade..... 76
- Figura 9.** Atividade da peroxidase do guaiacol em folhas e raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Análise de variância (valores <i>F</i>) para os dados de área foliar, massa seca da parte aérea e das raízes e relação entre massa seca da parte aérea e das raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade.....	46
Tabela 2.	Análise de variância (valores <i>F</i>) para os dados de potencial osmótico de folhas e raízes e para o teor relativo de água foliar de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade.....	50
Tabela 3.	Análise de variância (valores <i>F</i>) para os dados de concentração de íons Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ e NO ₃ ⁻ em folhas e raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade.....	54
Tabela 4.	Concentração de íons Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ e NO ₃ ⁻ em folhas e raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade.....	55
Tabela 5.	Análise de variância (valores <i>F</i>) para os dados de concentração de solutos orgânicos em folhas de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade.....	59
Tabela 6.	Concentração de solutos orgânicos em folhas de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade.....	60
Tabela 7.	Análise de variância (valores <i>F</i>) para os dados de teores relativos de clorofila e emissão de fluorescência pela clorofila <i>a</i> de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade.....	64
Tabela 8.	Análise de variância (valores <i>F</i>) para os dados de atividade das enzimas do estresse oxidativo (SOD, CAT, APX e GPX) em folhas e raízes e peroxidação de lipídios nas folhas de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva a baixa, média e alta salinidade.....	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. O solo e a salinidade.....	18
2.2. As plantas e a salinidade.....	19
2.3. O estresse oxidativo e a salinidade.....	22
2.3.1. As principais ROS e as plantas.....	22
2.3.2. Mecanismos enzimáticos de eliminação das ROS.....	25
2.3.3. Mecanismos não-enzimáticos de eliminação das ROS.....	29
2.4. As espécies estudadas.....	30
2.4.1. O algodão.....	30
2.4.2. O feijão-de-corda.....	32
2.4.3. O sorgo.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Geral.....	35
3.2. Específicos.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	36
4.2. Coleta das plantas e análises de crescimento.....	37
4.3. Potencial osmótico e teor relativo de água.....	38
4.4. Solutos inorgânicos em folhas e raízes.....	38
4.5. Solutos orgânicos em folhas.....	39
4.5.1. Carboidratos solúveis.....	39
4.5.2. Proteínas solúveis.....	40
4.5.3. N-aminossolúveis.....	40
4.5.4. Prolina.....	41
4.6. Teores relativos de clorofila e emissão de fluorescência pela clorofila <i>a</i>	41
4.7. Peroxidação de lipídios de membrana.....	42
4.8. Atividade das enzimas do estresse oxidativo.....	43
4.8.1. Preparação dos extratos de folhas e raízes.....	43

4.8.2. Dismutase do superóxido.....	43
4.8.3. Catalase.....	44
4.8.4. Peroxidase do ascorbato.....	44
4.8.5. Peroxidase do guaiacol.....	44
4.9. Análise estatística.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1. Análise do crescimento.....	46
5.2. Potencial osmótico e teor relativo de água.....	50
5.3. Solutos inorgânicos em folhas e raízes.....	53
5.4. Solutos orgânicos em folhas.....	59
5.5. Teores relativos de clorofila e emissão de fluorescência pela clorofila <i>a</i>	63
5.6. Peroxidação de lipídios de membrana e atividade das enzimas do estresse oxidativo.....	67
6. CONCLUSÕES.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

Em qualquer lugar que as plantas cresçam, elas estarão sujeitas às condições de múltiplos estresses, que por sua vez limitarão seu crescimento e desenvolvimento (LARCHER, 2000). O estresse pode ser definido como qualquer alteração das condições ótimas para a vida de um ser vivo, que possa induzir modificações em todos os seus níveis funcionais, limitar o seu desenvolvimento e reduzir as suas possibilidades de sobrevivência, podendo o mesmo ser originado de fatores bióticos ou abióticos (LARCHER, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os estresses abióticos podem ser ocasionados por inúmeros fatores, como metais pesados (SMEETS *et al.*, 2009), radiação ultravioleta (GAO; ZHANG, 2008), seca (SIMOVA-STOILOVA *et al.*, 2009), frio (VAN HEERDEN *et al.*, 2003), altas temperaturas (FERREIRA-SILVA, 2008) e salinidade (MELONI *et al.*, 2003). Dentre os inúmeros estresses abióticos aos quais as plantas estão constantemente expostas pode-se citar o estresse salino como um dos que mais compromete o crescimento e a produtividade das plantas em todo o mundo (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003; VEERANAGAMALLAIAH *et al.*, 2007), chegando a afetar mais de 800 milhões de hectares (ha) das terras de todo o globo terrestre (FAO, 2005).

As áreas salinizadas ocorrem naturalmente em todo o mundo, e são ocasionadas por processos naturais tais como desintegração de rochas, carregamento de sal pelo vento oceânico e deposição de sal pela chuva. A água da chuva contém de 6-50 mg kg⁻¹ de cloreto de sódio, sendo essa concentração decrescida com o aumento da distância da costa (MUNNS; TESTER, 2008). Dessa maneira, quantidades consideráveis de sais são depositadas no solo ao longo dos anos. Além disso, causas antrópicas como a retirada de vegetação e práticas de irrigação inadequadas salinizam uma proporção significativa de áreas cultiváveis (MUNNS;

TESTER, 2008). Estima-se que cerca de 45 (19,6%) dos 230 milhões de ha da área irrigada do globo terrestre sejam afetadas por sais, concentrando-se principalmente nas regiões áridas e semi-áridas. Acredita-se que cerca de 25% da área irrigada do Nordeste brasileiro estejam salinizadas (FAO, 2005) e que isto se deva ao manejo inadequado do solo e da água, associado às elevadas taxas evapotranspiratórias e às baixas precipitações pluviométricas características dessas regiões (FAGERIA; GHEYI, 1997).

De maneira geral, o estresse salino é constituído de dois componentes: o osmótico e o iônico. O primeiro é uma decorrência da alta concentração de sais no ambiente radicular que provoca diminuição do potencial hídrico do solo e reduz a disponibilidade de água para a planta. O componente iônico decorre do acúmulo de certos íons (em geral, Na^+ e Cl^-) e pode provocar desequilíbrio nutricional, toxidez ou ambos (GREENWAY; MUNNS, 1980; MUNNS, 2002; MUNNS; TESTER, 2008). Em adição a esses efeitos, o estresse salino também provoca um desbalanço no status redox das células, gerando um estresse oxidativo através da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), tais como os radicais livres superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroxil (HO^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003). Essas ROS são altamente reativas e podem alterar o metabolismo celular normal através da oxidação de biomoléculas importantes como as proteínas e os ácidos nucleicos (McKERSIE; LESHEM, 1994; MITTLER, 2002).

Para minimizar os danos oxidativos causados pelas ROS, as plantas desenvolveram um sistema antioxidativo complexo que inclui tanto antioxidantes não-enzimáticos de baixa massa molecular (principalmente o ascorbato e a glutatona) quanto enzimas eliminadoras de ROS, tais como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases do ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX) (McKERSIE; LESHEM, 1994). O radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é eliminado principalmente pela SOD, resultando na formação de H_2O_2 (ALSCHER;

ERTURK; HEATH, 2002). O H_2O_2 produzido é, então, removido pelas atividades da CAT e das peroxidases (McKERSIE; LESHEM, 1994).

A maneira como as plantas respondem quando são submetidas a condições de estresse salino difere grandemente entre as espécies, gerando padrões diferenciados de tolerância tanto em espécies dicotiledôneas como em espécies monocotiledôneas. Nos últimos anos, inúmeros são os trabalhos que relacionam estudos comparativos entre espécies com graus diferenciados de tolerância aos estresses, buscando obter informações acerca dos mecanismos que propiciam tal tolerância (MELONI *et al.*, 2003; JOGESWAR *et al.*, 2006; SIMOVA-STOILOVA *et al.*, 2009). Essa abordagem comparativa mostra-se promissora na identificação de características que confirmam às plantas tolerância à salinidade, a fim de se obter informações relevantes sobre os mecanismos de tolerância à salinidade que sejam úteis como critérios de seleção em programas de melhoramento, bem como possam ser utilizados como indicadores de diagnóstico precoce em condições de campo, podendo auxiliar na tomada de decisões de práticas adequadas para a melhoria da produtividade de diferentes espécies em condições agricultáveis.

Dessa maneira, o objetivo do trabalho foi avaliar parâmetros fisiológicos e bioquímicos em três espécies vegetais (algodão, feijão-de-corda e sorgo) com graus diferenciados de tolerância ao estresse salino, a fim de melhor entender suas diferenças na tolerância à salinidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O solo e a salinidade

A classificação de um solo como salino baseia-se no valor da condutividade elétrica (CE) capaz de reduzir significativamente a produção da maioria das culturas (MUNNS; TESTER, 2008). Segundo Richards (1954), Daker (1976) e USDA-ARS (2008), um solo é considerado salino quando o valor da CE do seu extrato de saturação é superior a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, o que equivale, aproximadamente, a uma solução de NaCl a 40 mM, com uma pressão osmótica em torno de 0,2 MPa.

A composição iônica dos solos salinos é bastante variável, mas pode-se afirmar que estão presentes os íons Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- e SO_4^{2-} , em proporções variadas, sendo também encontrados em menores quantidades os íons K^+ , HCO_3^- , CO_3^{2-} e NO_3^- (CORDEIRO, 2001). Eles resultam dos processos de intemperismo dos minerais e das rochas da crosta terrestre, ocasionados por ação de fatores tais como clima, relevo e organismos vivos, envolvendo eventos físicos, químicos e biológicos, especialmente os químicos (hidrólise, hidratação, dissolução, oxidação e carbonatação), que são os responsáveis final pela liberação gradual dos mesmos para a solução do solo (DAKER, 1976). Dessa maneira, a salinização dos solos tem origem no seu próprio processo de formação. Além disso, os íons presentes na água do mar constituem um fator que contribui para processos naturais de salinização, especialmente nas regiões costeiras (AYERS; WESTCOT, 1991).

Outra fonte de salinização dos solos, porém decorrente da atividade humana, constitui-se no emprego de práticas de irrigação incompatíveis com as características físicas, químicas e mineralógicas do perfil do solo, bem como a aplicação de fertilizantes de forma excessiva que, associada à baixa precipitação pluviométrica e à elevada superfície evaporativa das

regiões áridas e semi-áridas, contribuem significativamente para os processos de salinização (FAGERIA; GHEYI, 1997; ASHRAF; FOOLAD, 2007).

Estimativas da FAO (2005) apontam que dos 1.500 milhões de ha utilizados para a agricultura de sequeiro, 32 milhões de ha (2,1%) são áreas afetadas por sais em graus variados. Já, dos cerca de 230 milhões de ha que constituem as terras irrigadas, 19,6% são afetadas por sais.

Com relação ao Brasil, embora não se tenha estudos definitivos sobre as áreas salinizadas, estima-se que 20 a 25% das áreas irrigadas enfrentam problemas causados pela salinização dos solos (FAO, 2000). Este fato é mais acentuado na região Nordeste, tendo em vista que 52% da sua área territorial (155 milhões de ha) corresponde ao semi-árido (LIRA *et al.*, 1982). Estudos em uma área de 110 milhões de ha na região Nordeste mostraram que 9% dessa área estavam afetadas pelo excesso de sais (FAO, 2000).

2.2. As plantas e a salinidade

A salinidade induz uma série de respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas que dependem de processos moleculares (WILLADINO; CÂMARA, 2005). Essas respostas variam amplamente entre as espécies e dependem do tipo de sal, do tempo e número de exposição ao estresse, do estado fenológico da planta (BRAY *et al.*, 2000), bem como de outros fatores.

Segundo Ayers e Westcot (1991), as plantas diferem grandemente no seu grau de tolerância à salinidade, como refletido por suas diferentes respostas nos parâmetros de crescimento. Algumas produzem rendimentos economicamente aceitáveis sob altos níveis de salinidade, enquanto outras são sensíveis a níveis relativamente baixos de sais. Assim, nas situações em que a salinidade do solo não pode ser mantida num nível aceitável para as

culturas exploradas economicamente, mediante um manejo adequado do solo e da água de irrigação, uma alternativa viável é a seleção criteriosa de espécies ou cultivares que, ao mesmo tempo, sejam mais tolerantes aos danos causados pelos sais e possam ter produções economicamente rentáveis.

Ashraf e Foolad (2007) relatam que os efeitos da salinidade sobre as plantas são consequência de fatores osmóticos e iônicos. O componente osmótico resultante das elevadas concentrações de sais dissolvidos na solução do solo reduz o potencial osmótico dessa solução, diminuindo, conseqüentemente, a disponibilidade de água para as plantas. O efeito iônico refere-se aos íons absorvidos pelas plantas (especialmente Na^+ e Cl^-), os quais podem provocar desequilíbrios nutricionais, toxidez ou ambos, no metabolismo da planta (MUNNS, 2002).

A redução do crescimento das plantas pela salinidade é um dos efeitos mais pronunciados e se dá em duas fases. A primeira, diz respeito aos efeitos do componente osmótico, ocorrendo devido ao excesso de sais que se encontram na solução do solo, mostrando-se extremamente semelhante, do ponto de vista metabólico e celular, ao que ocorre em plantas sob estresse hídrico. Já a segunda, ocorre a partir do efeito direto dos sais que ao serem absorvidos acabam concentrando-se em quantidades superiores àquelas que as plantas são capazes de compartimentar em seus vacúolos, ficando dessa maneira dissolvidos no citosol e em outras organelas onde acabam interferindo em inúmeras reações enzimáticas (MUNNS, 2005; MUNNS; TESTER, 2008).

A salinidade, como apontado por diversos autores, inibe os processos de fotossíntese e transpiração (TAIZ; ZEIGER, 2004; PARIDA; DAS, 2005). Essa inibição pode estar correlacionada com o grau de fechamento dos estômatos (GREENWAY; MUNNS, 1980) ou com o acúmulo excessivo dos íons sódio e cloreto nos cloroplastos, os quais afetam as reações

bioquímicas e fisiológicas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Em adição a esses efeitos diretos da salinidade sobre as plantas, inúmeros efeitos secundários também podem surgir e ocasionar outras patologias (ZHU, 2001).

Os efeitos adversos da salinidade sobre as plantas podem ser ocasionados pelo estresse osmótico, toxicidade iônica e/ou deficiência nutricional (ZHU, 2002). A inibição do crescimento ocorre em todas as plantas que são submetidas às condições salinas. Contudo, o grau no qual o crescimento das plantas é reduzido dependerá das diferenças nos níveis de tolerância entre as espécies e entre cultivares de uma mesma espécie (MUNNS, 2002; PARIDA; DAS, 2005). Em relação a tolerância à salinidade, as plantas têm sido classificadas em halófitas e glicófitas. As halófitas são aquelas que crescem em solos salinos e toleram altas concentrações de sais, enquanto que as glicófitas, que compreendem a maioria das plantas cultivadas, são sensíveis aos sais e não toleram longa ou breve exposição a ambientes salinos (GREENWAY; MUNNS, 1980). Durante o estresse salino, todos os principais processos da planta, como a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteínas, as relações hídricas e as reações enzimáticas, são afetados e a primeira resposta é a redução da taxa de crescimento foliar, seguida de cessação quando o estresse intensifica (MUNNS, 2002; PARIDA; DAS, 2005).

Num curto intervalo de tempo, como de minutos a horas, apenas o efeito osmótico atua sobre a planta, induzindo variações essencialmente instantâneas (MUNNS, 2002). Para minimizar os efeitos osmóticos, as plantas podem acumular solutos orgânicos de baixo peso molecular chamados de osmorreguladores. Dentre esses solutos, destacam-se compostos nitrogenados, tais como aminoácidos, inclusive a prolina, e compostos quaternários de amônio, entre eles a glicinabetaína e os poliídrolícos (carboidratos e poliálcoois) os quais são acumulados em plantas sob condições de estresse (ASHARAF; HARRIS, 2004). Além

disso, halófitas e glicófitas utilizam ainda, os sais absorvidos do meio (preferencialmente Na^+ e Cl^-) para seu ajustamento osmótico (FLOWERS; COLMER, 2008).

Os problemas de toxicidade normalmente surgem quando os íons solúveis no solo são acumulados nas plantas de forma excessiva, provocando danos ao seu crescimento (GREENWAY; MUNNS, 1980; MUNNS, 2002; MUNNS; TESTER, 2008). De acordo com ZHU (2001), as plantas desenvolveram mecanismos para prevenir e aliviar os danos provocados pelo excesso de sais, a fim de restabelecer as condições homeostáticas para se aclimatar ao novo ambiente, retomando seu crescimento, ainda que a taxas reduzidas. De modo geral, a tolerância das plantas à salinidade depende da habilidade em controlar o transporte de sal, em cinco pontos específicos: i) seletividade no processo de absorção pelas células das raízes; ii) carregamento do xilema com K^+ em detrimento do Na^+ ; iii) remoção do sal do xilema na parte superior das diversas partes da planta; iv) minimização da translocação dos íons Na^+ e Cl^- para a parte aérea em crescimento; v) excreção de sais por estruturas especializadas. A tolerância em glicófitas depende dos três primeiros mecanismos, os quais ocorrem em diferentes graus, em função da espécie e/ou cultivar (MUNNS, *et al.*, 2002).

2.3. O estresse oxidativo e a salinidade

2.3.1. As principais ROS e as plantas

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes versus compostos pró-oxidantes, levando ao aumento do nível das espécies reativas de oxigênio (ROS). A sinalização para o mecanismo de desintoxicação das plantas, provavelmente, não ocorre devido às mudanças iônicas ou osmóticas, mas ao aumento dessas ROS ou à própria desnaturação das proteínas (ZHU, 2002).

Nas plantas, existem inúmeros sítios potenciais de geração de ROS, incluindo: apoplasto, cloroplastos, membrana plasmática, mitocôndrias, parede celular e peroxissomos (ASADA, 1999; DAT *et al.*, 2000; FOYER; NOCTOR, 2000; GRANT; LOAKE, 2000; MØLLER, 2001; DEL RIO *et al.*, 2002). As ROS mais comumente encontradas são o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroxil (HO^{\bullet}). Elas são consideradas subprodutos inevitáveis do metabolismo celular anaeróbico e de processos fotoxidativos (NOCTOR; FOYER, 1998) e sua produção se dá principalmente nas mitocôndrias (MØLLER, 2001), nos cloroplastos (FOYER; NOCTOR, 2000) e nos peroxissomos (DEL RIO *et al.*, 2002).

As ROS, quando em altas concentrações, são moléculas tóxicas capazes de ocasionar danos aos diversos componentes das células, como DNA, lipídios e proteínas (APEL; HIRT, 2004). Sob condições ótimas de crescimento, sua produção é mantida em baixos níveis. Entretanto, sob condições adversas, como os estresses hídrico e salino, sua taxa de produção pode ser drasticamente aumentada (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003). Tradicionalmente, tais espécies químicas foram consideradas produtos tóxicos do metabolismo aeróbico, entretanto, evidências mais recentes indicam uma possível participação das ROS na sinalização celular, atuando como mensageiros secundários para a ativação de respostas aos estresses e em mecanismos de defesa (MITTLER, 2002; MITTLER, *et al.*, 2004).

As ROS são formas parcialmente reduzidas do oxigênio atmosférico (O_2). Elas resultam tipicamente da excitação do mesmo para formar oxigênio singlete ou pela transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 , formando, respectivamente, o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio ou o radical hidroxil (MITTLER, 2002).

A produção do radical superóxido pode ocorrer em qualquer sítio celular que possua uma cadeia transportadora de elétrons, como as mitocôndrias e os cloroplastos, ou em outros

locais onde ocorrem reações redox, como microssomos, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e citosol (FOYER; NOCTOR, 2005). Esse radical não é hábil para reagir diretamente com proteínas e lipídios, mas sua forma protonada (radical peridroxil) pode ocasionar a peroxidação de lipídios (ASADA; TAKAHASHI, 1987, citado por JALLEL *et al.*, 2009). Além disso, o $O_2^{\bullet-}$ é conhecido por inibir a atividade de peroxidases e redutases de ribonucleotídeos, podendo também ocasionar, indiretamente toxicidade, pela produção de H_2O_2 e radical hidroxil (ASADA; KISO; YOSHIKAWA, 1974; ASADA; TAKAHASHI, 1987; FOYER; HARBISON, 1994, citados por JALLEL *et al.*, 2009).

O H_2O_2 é, geralmente, formado nos peroxissomos pela atividade da enzima oxidase do glicolato, podendo, também, ocorrer sua formação em microcorpos, como subproduto da oxidação de ácidos graxos durante as reações catabólicas de lipídios (MØLLER, 2001) ou pela dismutação do superóxido pela ação da SOD, presente em mitocôndrias, citosol e peroxissomos (ASADA; KISO; YOSHIKAWA, 1974, citado por JALLEL *et al.*, 2009).

Além de serem extremamente reativos, o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 podem formar o radical hidroxil, que é uma ROS fortemente reativa podendo ocasionar peroxidação lipídica e também danificar moléculas essenciais, como DNA e proteínas (MITTLER, 2002).

Uma vez que as ROS são tóxicas, mas também participam de eventos de sinalização celular, as células vegetais devem possuir pelo menos dois mecanismos para regular suas concentrações intracelulares: um, por modulação fina dos seus baixos níveis e outro, por permitir a desintoxicação do seu excesso, especialmente em condições de estresse (MITTLER, 2002). Em função disso, as plantas desenvolveram mecanismos para manter a relação produção/eliminação de ROS constante no interior das células (APEL; HIRT, 2004), utilizando para isso sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos (ASADA, 1999).

2.3.2. Mecanismos enzimáticos de eliminação das ROS

As plantas possuem mecanismos específicos para a desintoxicação das ROS, os quais incluem a ativação de enzimas, como CAT, peroxidases e SOD, bem como aquelas que participam do ciclo ascorbato-glutationa [peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutathione (GR), redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) e redutase do desidroascorbato (DHAR)] (FOYER; NOCTOR, 2003).

A SOD é uma metalo-proteína responsável pela dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, sendo considerada a primeira linha de defesa das plantas contra o estresse oxidativo (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Em plantas superiores, a SOD apresenta-se na forma de três isoenzimas: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD que são classificadas de acordo com o íon metálico no grupo prostético (ASADA, 1999; ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002). Além disso, Scandalios (2002) e Ashraf (2009) afirmam que existe ainda um quarto tipo de SOD, cujo íon metálico é o níquel (Ni).

Diversos estudos mostram que a SOD, além de participar da eliminação das ROS geradas durante o metabolismo aeróbio, também atua na proteção contra danos oxidativos ocasionados por estresses abióticos, em várias espécies vegetais. Aumentos significativos na atividade das isoenzimas de SOD, associados com outros mecanismos de defesa, estão correlacionados com a proteção oxidativa e subsequente tolerância de *Bruguiera parviflora* a altos níveis de salinidade, como evidenciado pelo comportamento de crescimento dessas plantas sob condições salinas (PARIDA; DAS; MOHANTY, 2004). Meloni *et al.* (2003), trabalhando com duas cultivares de algodão contrastantes na tolerância à salinidade, demonstraram que a cultivar mais tolerante apresentou maior indução do sistema envolvendo a SOD, a GR e a POD (peroxidase do guaiacol, também conhecida como GPX), que permitiu

menor dano oxidativo, como comprovado pela menor taxa de peroxidação lipídica, comparada com a cultivar sensível.

Estresses ambientais, como radiação ultravioleta e metais pesados, podem também modular a atividade da SOD. Em estudos com plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a CdSO_4 , CuSO_4 ou ambos, na concentração de 10 μM , por 24 horas, foi observado que houve aumentos significativos na atividade das enzimas SOD e CAT, bem como aumentos nos níveis de transcritos dos genes que codificam proteínas de defesa contra estresse oxidativo, tanto do sistema enzimático como do não-enzimático (SMEETS *et al.*, 2009).

O peróxido de hidrogênio gerado a partir da atividade da SOD é tóxico e precisa ser removido da célula em reações subseqüentes. Nas plantas, as enzimas APX, CAT e GPX são os principais reguladores dos níveis intracelulares de H_2O_2 (FOYER; NOCTOR, 2003). Azevedo Neto *et al.* (2005), trabalhando com plantas de milho sob condições de estresse salino, mostraram que as atividades dessas enzimas aumentaram substancialmente nos genótipos tolerantes, em relação aos genótipos sensíveis, indicando que sob estresse, o mecanismo removedor de H_2O_2 é mais eficaz nos genótipos tolerantes. Além disso, os autores sugerem que a CAT é a enzima removedora de H_2O_2 mais importante nas folhas, enquanto a GPX é a mais importante nas raízes.

A CAT é uma enzima tetrâmera, contendo um grupo heme em cada subunidade (HORVÁTH *et al.*, 2002), sendo responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (MØLLER, 2001). Ela está localizada predominantemente nos peroxissomos e glioxissomos e atua na remoção do peróxido de hidrogênio gerado durante a fotorrespiração e β -oxidação dos ácidos graxos (XIONG; ZHU, 2002). A CAT é essencial para a remoção do H_2O_2 gerado nos peroxissomos durante o processo de fotorrespiração,

evitando seu acúmulo excessivo nessa organela, além de impedir seu vazamento para outros compartimentos da célula (FOYER; NOCTOR, 2000).

Inúmeros estudos indicam que a atividade da CAT apresenta uma modulação diferenciada entre as espécies. Costa *et al.* (2005), estudando dois genótipos de sorgo com diferenças na tolerância ao estresse salino, observaram que a atividade desta enzima no genótipo tolerante (CSF 20) foi significativamente aumentada em relação ao sensível. Segundo esses autores, os resultados encontrados no estudo sustentam a hipótese de que a maior eficiência do sistema enzimático antioxidante do genótipo CSF 20 poderia ser considerada como um dos fatores responsáveis por sua tolerância ao estresse salino. Em contraste, a atividade da CAT em folhas de *Bruguiera parviflora* foi intensamente diminuída pelo estresse salino (PARIDA; DAS; MOHANTY, 2004).

Da mesma forma que a CAT, a APX desempenha um papel vital na defesa das plantas contra o estresse oxidativo. A APX utiliza especificamente o ascorbato como doador de elétrons na reação de eliminação do H_2O_2 , protegendo as células contra os efeitos nocivos dessa substância (ASADA, 1992; SHIGEOKA *et al.*, 2002, FOYER; NOCTOR, 2005). A APX está localizada em diversos compartimentos celulares, como citosol, cloroplastos, glioxissomos, mitocôndrias e peroxissomos (SHIGEOKA *et al.*, 2002). Diferentes isoformas de APX são encontradas nas plantas, podendo ser solúveis, como as encontradas no citosol e estroma, e formas associadas às membranas, como aquelas presentes nos microcorpos, tilacóides e mitocôndrias (ASADA, 1992). O estresse salino é um dos estresses abióticos que possui a capacidade de modular a atividade da APX. Em estudos realizados com plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), foi observado que das oito isoformas de APX existentes nas raízes a expressão de apenas um dos genes (*OsAPx8*) associados com essas isoformas esteve

associado com o componente iônico e não com o componente osmótico da salinidade (HONG; KAO, 2008).

Yasar, Ellialtioglu e Yildiz (2008) observaram que as diferenças associadas à tolerância à salinidade em duas variedades de feijão estão intimamente ligadas às diferenças nas atividades das enzimas CAT e APX. De fato, a atividade dessas enzimas foi maior na variedade tolerante. Segundo Mittler (2002), a diferença entre a afinidade da APX (alta, da ordem de μM) e da CAT (baixa afinidade, da ordem de mM) pelo H_2O_2 sugere a existência de duas classes de enzimas eliminadoras das ROS no interior das células. A APX seria responsável pela modulação fina nos níveis das ROS, enquanto que a CAT seria responsável pela remoção do excesso de ROS geradas durante as condições de estresse.

Além da APX, outro tipo de peroxidase encontrada em plantas é a que utiliza o guaiacol como doador de elétrons nos ensaios *in vitro* (ASADA, 1999). Essa enzima, peroxidase do guaiacol (GPX), é uma peroxidase não-específica que se apresenta em diferentes isoformas e quantidades entre as diversas plantas, ou mesmo entre as diferentes partes de uma mesma planta (YE *et al.*, 1990; SREENIVASULU *et al.*, 1999). As GPX estão localizadas no vacúolo, na parede celular e no citosol (ASADA, 1992) e estão envolvidas ativamente na tolerância ao estresse oxidativo induzido pela salinidade em plantas de milho, quando sua atividade é coordenada com outras enzimas, como SOD, CAT e APX (AZEVEDO NETO *et al.*, 2005).

Diversos autores têm ressaltado a importância da coordenação entre a atividade da SOD e as atividades das enzimas CAT, APX e GPX, nos processos de remoção de ROS, como o radical superóxido e o H_2O_2 , e conseqüentemente com a tolerância à salinidade (MITTOVA *et al.*, 2002; MELONI *et al.*, 2003; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005). Além disso,

Ashraf (2009) listou inúmeros estudos que evidenciam que a superexpressão de genes para enzimas antioxidantes é responsável pela tolerância ao estresse salino em diferentes culturas.

2.3.3. Mecanismos não-enzimáticos de eliminação das ROS

Os antioxidantes não-enzimáticos incluem o ascorbato (ASC) e a glutatona (GSH), bem como o tocoferol, os flavonóides, os alcalóides e os carotenóides. Enquanto a GSH é oxidada pelas ROS, formando glutatona oxidada (GSSG), o ASC é oxidado a monodesidroascorbato (MDHA) e desidroascorbato (DHA). Através do ciclo ascorbato-glutatona, GSSG, MDHA e DHA podem ser reduzidos e formarem novamente ASC e GSH (APEL; HIRT, 2004). Essas moléculas desempenham um papel-chave na eliminação de radicais livres nas plantas, doando elétrons ou hidrogênios para esses radicais, levando-os a um estado menos nocivo às plantas (ASADA, 1999). ASC e GSH encontram-se em altas concentrações no interior das células, estando distribuídos no citosol, mitocôndria, peroxissomo, apoplasto e, principalmente, no interior dos cloroplastos (MITTLER, 2002). Segundo Noctor e Foyer (1998), ASC e GSH são os dois mais importantes antioxidantes não-enzimáticos. Eles atuam como doadores de elétrons para que alguns sistemas de defesa enzimáticos possam eliminar as ROS do interior celular.

No ciclo ascorbato-glutatona, duas moléculas de ASC são utilizadas pela APX para reduzir o H_2O_2 e formar água com a geração concomitante de MDHA. Esse é um radical com um curto tempo de vida, que pode desprotonar-se espontaneamente, gerando DHA e ASC. Além de ocorrer de forma espontânea, a redução do MDHA a ASC pode também utilizar doadores de elétrons específicos, como ferredoxina ou o NADPH (ASADA, 1999). O ASC pode também agir diretamente na eliminação de ROS como $O_2^{\bullet-}$ e HO^{\bullet} , regenerando o tocoferol a partir da redução da sua forma oxidada (SMIRNOFF, 2000). O tocoferol (vitamina E) é um antioxidante lipofílico sintetizado por todas as plantas. Ele interage com o grupo

ácido poliinsaturado dos lipídios, estabilizando as membranas celulares, podendo também interagir com as ROS e impedir as reações finais que causam a peroxidação de lipídios em diferentes membranas (WANG; QUINN, 2000).

A glutathione é um tripeptídeo (*γ-glutamyl-cisteína-glicina*) que tem sido detectado praticamente em todos os compartimentos celulares, como citosol, cloroplastos, retículo endoplasmático, vacúolo e mitocôndria (JIMÉNEZ *et al.*, 1997). Sua síntese ocorre no citosol ou nos cloroplastos, onde estão localizadas as enzimas que compõem a via biossintética desse tripeptídeo (NOCTOR; FOYER, 1998; FOYER; NOCTOR, 2005). A glutathione, por atuar na regeneração do ascorbato e combater as ROS, é de fundamental importância para as plantas (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002).

2.4. As espécies estudadas

2.4.1. O algodão

Atualmente são cultivados no mundo dois tipos de algodão: o arbóreo e o herbáceo. O algodão arbóreo é cultivado exclusivamente na região Nordeste, tendo como principal característica ser uma cultura perene. Já o herbáceo (*Gossypium hirsutum* L.) é um arbusto de cultivo anual. Das 50 espécies agrupadas no gênero *Gossypium*, 17 são endêmicas da Austrália, seis do Havaí e uma do nordeste brasileiro. Cerca de 90% das fibras de algodão comercializadas no mundo são provenientes da espécie *Gossypium hirsutum* (ALGODÃO BRASILEIRO, 2009).

O Brasil é o quinto maior produtor e um dos maiores exportadores mundiais de algodão em pluma. Desde a safra 2007/08, vem ocupando a quarta colocação no *ranking* mundial de exportação, com mais de 50% das vendas concentradas em três destinos: Paquistão, Indonésia e Coréia do Sul (DESENBAHIA, 2009).

A safra de 2007, relativa à produção nacional de algodão herbáceo em caroço, totalizou 4.097.490 toneladas, superando em 41,4% a safra de 2006. Esse incremento significativo deveu-se à ampliação da área de colheita, que alcançou 1.119.746 ha, ou seja, uma área 19,8% maior que a de 2006 (898.008 ha) (IBGE, 2007). Já nas safras 2008/09, a produção foi reduzida a 2.943.816 toneladas e para a safra 2009/10, estima-se que a produção nacional de algodão herbáceo continue decrescendo (IBGE, 2009). No Brasil, as regiões que produzem as maiores quantidades de algodão herbáceo em caroço são o Centro-oeste e o Nordeste, com destaque para o Mato Grosso e a Bahia, que em 2007, foram responsáveis respectivamente, por 54% e 27% do total de algodão herbáceo em caroço (t) produzidas no Brasil.

A cultura do algodão herbáceo no semi-árido nordestino foi e continua sendo uma das principais atividades do meio rural, em especial dos pequenos e médios produtores. Atualmente, ocupa uma área plantada de 354.777 ha na região, principalmente nos estados da Bahia (301.928 ha), Piauí (13.778 ha) e Rio Grande do Norte (9.182 ha), com plena possibilidade de crescimento e desenvolvimento, via programas de recuperação desta cultura no semi-árido de todos os Estados que compõem a referida região (IBGE, 2007).

Em relação à salinidade o algodoeiro é considerado uma cultura tolerante possuindo um limiar de salinidade ao redor de $7,7 \text{ dS m}^{-1}$ no extrato de saturação do solo e $5,1 \text{ dS m}^{-1}$ na água de irrigação (AYERS; WESTCOT, 1999). Embora o algodão seja considerado uma cultura tolerante, pode sofrer reduções substanciais no seu crescimento e na sua produção quando exposto à condição de salinidade. Em estudo realizado com cinco genótipos de algodão Jácome *et al.* (2003), observou que no geral, os genótipos foram sensíveis à salinidade nas variáveis de crescimento, sendo os pesos da fitomassa de caule, dos ramos e da

raiz a mais afetadas em todos os genótipos, com reduções superiores a 20% já no nível de 4 dS m⁻¹.

2.4.2. O feijão-de-corda

No Brasil, o feijão-de-corda é cultivado predominantemente no sertão semi-árido da região Nordeste, onde a produção e a produtividade em 2007 foram de 789.349 t e 383 kg ha⁻¹, respectivamente. Sendo os maiores produtores os Estados da Bahia, do Ceará e de Pernambuco, os quais também apresentam as maiores áreas plantadas (IBGE, 2007).

Essa leguminosa é uma importante fonte alimentar para as populações da região Norte e Nordeste do Brasil, principalmente para as populações menos favorecidas financeiramente, bem como para populações pobres de outros países onde ele é produzido, devido especialmente ao seu alto valor nutricional. Segundo Silva *et al.* (2002), o estudo da composição química de 45 genótipos de feijão dessa espécie revelaram que os mesmos apresentaram altos teores de carboidrato (55,64 a 74,54 g/100 g de farinha) e de proteína bruta (20,29 a 29,29 g/100 g de farinha), baixos teores de lipídio total (0,53 a 2,90 g/100 g de farinha) e teores de cinza variando de 3,02 a 3,81 g/100 g de farinha.

Pelo seu valor nutritivo, o feijão-de-corda é cultivado principalmente para a produção de grãos (secos ou verdes), visando o consumo humano *in natura*, na forma de conserva ou desidratado. Além disso, o feijão-de-corda também é utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo (ANDRADE JÚNIOR; SANTOS; SOBRINHO, 2003).

Segundo Ayers e Westcot (1991), o feijão-de-corda é uma cultura moderadamente tolerante à salinidade, sendo afetado por níveis de salinidade a partir de 4,9 dS m⁻¹ de condutividade elétrica. No entanto, as concentrações de sais que restringem o crescimento

dessa espécie variam amplamente com o estágio de desenvolvimento no qual é aplicado o estresse, sua duração e intensidade, bem como o genótipo utilizado (SILVEIRA *et al.*, 2001).

2.4.3. O sorgo

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é uma gramínea de origem africana, introduzida no Brasil no início do século XX, e que é utilizada tanto para produção de grãos como para produção de forragem. É uma espécie de elevado potencial produtivo, principalmente em regiões sujeitas ao estresse hídrico, onde tem boa adequação à mecanização. Além do uso de seus grãos como alimento humano e animal e como matéria-prima para produção de álcool anidro, bebidas alcoólicas, colas e tintas (RIBAS, 2008). É o quinto cereal mais importante no mundo, precedido pelo trigo, arroz, milho e cevada, sendo utilizado como principal fonte de alimento em grande parte dos países da África, Sul da Ásia e América Central e importante componente da alimentação animal nos Estados Unidos, Austrália e América do Sul (TARDIN; RODRIGUES, 2008)

No Brasil, o sorgo produzido é destinado principalmente à indústria de alimentos para aves, suínos e ruminantes, sendo os Estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul os maiores produtores a nível nacional (IBGE, 2007). As zonas de adaptação da cultura se concentram no Sul (região de fronteira), em plantios de verão, no Brasil Central, em sucessão a plantios de verão (safrinha), e no Nordeste, em plantios nas condições do semi-árido com altas temperaturas e precipitação inferior a 600 mm anuais (TARDIN; RODRIGUES, 2008).

Ainda que o sorgo seja uma cultura tolerante ao déficit hídrico, o sucesso de sua implementação no Nordeste brasileiro depende também da capacidade da planta para crescer em solos com excesso de sais dissolvidos. Em relação à salinidade, essa espécie é considerada moderadamente tolerante (FAO, 2005) suportando salinidades entre 4 e 6 dS m⁻¹ de

condutividade elétrica, embora haja diferença no grau de tolerância entre os diferentes genótipos (LACERDA *et al.*, 2003b).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Identificar através de análises fisiológicas e bioquímicas os parâmetros que possam relacionar-se com o melhor desempenho do algodão, em meio salino, quando comparado com o sorgo, e o feijão-de-corda.

3.2. Específicos

Utilizando-se plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo como material experimental, pretende-se:

1. Estudar os efeitos da salinidade no crescimento, no potencial osmótico de folhas e raízes e nos teores relativos de água nas folhas;
2. Caracterizar o acúmulo e a distribuição de íons (Na^+ , K^+ , Cl^- e NO_3^-) induzidos pela salinidade, em folhas e raízes;
3. Verificar se existem mudanças no acúmulo de proteínas solúveis, N-aminossolúveis, carboidratos solúveis e prolina livre nas folhas das três espécies estudadas submetidas à salinidade;
4. Avaliar possíveis danos oxidativos ao aparelho fotossintético, através da análise dos parâmetros de emissão de fluorescência da clorofila *a* e dos teores de clorofila;
5. Analisar os danos oxidativos causados pela salinidade sobre os lipídios de membrana (MDA) em folhas;
6. Estabelecer o papel do sistema antioxidativo enzimático em folhas e raízes na defesa das plantas contra as ROS produzidas durante o estresse.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e condições de cultivo

O presente experimento foi conduzido em casa de vegetação e as análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas nos Laboratórios de Fisiologia Vegetal 1 e 2, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC) nos meses de abril a maio de 2009. Os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar durante o período experimental, registrados com o auxílio de um termohigrógrafo, foram, respectivamente, $28,5 \pm 0,33^{\circ}\text{C}$ e $65,5 \pm 1,98\%$. Foram utilizadas três espécies vegetais: algodão (*Gossypium hirsutum*), cultivar BRS 113 7MH, feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivar Epace 10, e sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], genótipo CSF 20.

Depois de selecionadas, as sementes foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio comercial a 0,7% de cloro ativo, durante 5 minutos. Em seguida, as mesmas foram exaustivamente lavadas com água destilada, para eliminar os resíduos do hipoclorito. As sementes foram colocadas para germinar em copos plásticos contendo vermiculita umedecida com solução nutritiva de Hoagland meia força (SNH ½). Decorridos cinco dias da germinação, as plântulas foram selecionadas com base no critério de uniformidade, sendo transferidas para meios hidropônicos em bacias plásticas (12 L) contendo SNH ½, a fim de que as mesmas fossem aclimatadas. Após seis dias nestas condições, as plantas foram novamente selecionadas com base no critério de uniformidade, sendo transferidas para baldes de 5 L (duas plantas/balde) e submetidas a três tratamentos salinos de condutividades elétricas (CE) de 0,9, 4,0 e 8,0 dS m⁻¹. O tratamento de menor condutividade elétrica constou do cultivo das plantas em SNH ½ (baixo nível de salinidade), enquanto que os tratamentos de 4,0 (médio nível de salinidade) e 8,0 dS m⁻¹ (alto nível de salinidade), constaram do cultivo das plantas em SNH ½ adicionada de NaCl de modo a

resultar nessas condutividades. Diariamente, o nível de solução foi repostado com água destilada e o pH foi monitorado, o qual manteve-se entre 5,5 e 6,5 pela adição de NaOH ou HCl a 1 N. A cada sete dias, a solução de cultivo foi trocada por uma nova.

O delineamento do experimento foi o inteiramente casualizado, obedecendo a um arranjo fatorial 3x3, correspondendo a três espécies e três tratamentos salinos. O experimento foi conduzido com cinco repetições e cada repetição se constituiu de duas plantas, perfazendo um total de 45 baldes e 90 plantas.

4.2. Coleta das plantas e análises de crescimento

Durante a coleta, que foi realizada aos 25 dias após o início do estresse, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz, sendo determinada a área foliar (AF), com um medidor de área (LI-3100, Li-Cor, Inc. Lincoln, NE, USA). Em seguida, as folhas foram separadas em três grupos: a 1ª folha completamente expandida, a partir da base, a qual foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -80°C, sendo utilizada para a determinação das atividades enzimáticas; a 2ª folha completamente expandida, a partir da base, que após a retirada dos discos foliares para determinação do teor relativo de água, foi utilizada para a obtenção do suco celular, no qual se determinaram o potencial osmótico (Ψ_s) e a concentração de solutos orgânicos e inorgânicos; e o restante das folhas, que foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 60°C, por 48 h. Cerca de 4 g do terço distal das raízes foram separados para as análises enzimáticas e para a determinação do Ψ_s e concentração de solutos inorgânicos. O restante do material proveniente das raízes foi seco em estufa, nas condições citadas anteriormente. Após a secagem do material coletado, determinou-se a massa seca (MS) das diferentes partes da planta, levando-se em consideração a matéria fresca retirada.

4.3. Potencial osmótico e teor relativo de água

O material destinado para a determinação do potencial osmótico (2ª folha completamente expandida, a partir da base) foi macerado em almofariz e posteriormente prensado e filtrado em uma seringa descartável, utilizando-se uma tela de náilon. O suco extraído do material vegetal foi centrifugado a 12.000 x g, por 10 min, a 4°C, obtendo-se, assim, o sobrenadante (suco celular), a partir do qual uma alíquota de 10 µL foi retirada e utilizada na determinação do Ψ_s , com o auxílio de um microosmômetro (VAPRO 5520, Wescor, Logan Utah, USA). Os valores de Ψ_s foram expressos em MPa.

Para a determinação do teor relativo de água (TRA), foram coletados 20 discos foliares de 1 cm de diâmetro, os quais foram pesados para a obtenção da massa fresca (MF). Os discos foliares foram transferidos para placas de Petri com água destilada e deixados imersos por 24 horas. A seguir, os discos foram removidos e colocados entre duas folhas de papel de filtro, sendo pressionados levemente para eliminação do excesso de água e, em seguida, pesados novamente para a obtenção da massa túrgida (MT). Logo após, os discos foram colocados em sacos de papel e postos em estufa de circulação forçada de ar a 60°C, até peso constante (48 h), sendo em seguida determinada a massa seca do material (MS). O teor relativo de água foi calculado pela equação: $TRA = 100[(MF - MS)/(MT - MS)]$, sendo expresso em percentagem.

4.4. Solutos inorgânicos em folhas e raízes

As concentrações dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e NO_3^- foram determinados no suco celular extraído dos tecidos de folhas e raízes. Os íons Na^+ e K^+ foram determinados por fotometria de chama, segundo Malavolta *et al.* (1989). Para a determinação de Cl^- , a 3,0 mL do suco celular, convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL da mistura formada por

tiocianato de mercúrio [Hg(SCN)₂] a 13,2 mM, em metanol absoluto, e nitrato férrico [Fe(NO₃)₃.9H₂O] a 20,2%, em água desionizada, na proporção de 4:1. Após agitação vigorosa, os tubos permaneceram em repouso por 15 min, sendo as concentrações de cloreto estimadas através de leituras de absorvância em 460 nm, utilizando-se NaCl como padrão. Como branco, foi utilizado um tubo de ensaio contendo água desionizada, em substituição ao suco celular (GAINES *et al.*, 1984). O NO₃⁻ foi determinado através do método do ácido salicílico (CATALDO *et al.*, 1975). Para isso, a 100 µL do suco celular, convenientemente diluído, foram adicionados 400 µL de ácido salicílico a 5%, em ácido sulfúrico concentrado. Depois de 20 min em repouso, foram adicionados 9.500 µL de NaOH a 2 M. Os tubos foram agitados vigorosamente e esperou-se atingirem a temperatura ambiente, para então se fazer as leituras de absorvância em 410 nm, utilizando-se NaNO₃ como padrão. Como branco foi utilizado um tubo de ensaio contendo água desionizada, com os demais constituintes da reação.

Para as determinações de Na⁺ e K⁺, foi feita uma leitura no fotômetro de chama para cada repetição, enquanto que para as de Cl⁻ e NO₃⁻ cada repetição foi dosada em duplicata. As concentrações de solutos inorgânicos foram expressas em mM.

4.5. Solutos orgânicos em folhas

4.5.1. Carboidratos solúveis

Os carboidratos solúveis foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). A mistura de reação foi constituída por 0,125 mL do suco celular convenientemente diluído, 0,125 mL de fenol a 5% e 0,625 mL de ácido sulfúrico concentrado. Utilizou-se como branco a mistura formada por 0,125 mL de água destilada em substituição ao suco celular, acrescida dos demais reagentes empregados na reação. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada

em repouso à temperatura ambiente por 20 min, para o seu resfriamento. Em seguida, procedeu-se à quantificação dos carboidratos solúveis através das medidas de absorvância em 490 nm, utilizando-se como padrão uma curva feita com a D(+) glicose anidra.

4.5.2. Proteínas solúveis

As concentrações de proteínas solúveis foram determinadas de acordo com o método descrito por Bradford (1976). A uma alíquota de 0,1 mL do suco celular, convenientemente diluído, foi adicionado 1,0 mL do reagente de coomassie. Este reagente foi preparado dissolvendo-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Company) em 50 mL de etanol a 95%, acrescidos de 100 mL de ácido fosfórico a 85%. O volume final da solução foi completado para 1.000 mL com água desionizada. As proteínas solúveis foram estimadas pelas medidas de absorvância em 595 nm, utilizando-se como branco a mistura formada de 0,1 mL de água desionizada e 1,0 mL do reagente de Coomassie. Como padrão foi utilizado a albumina de soro bovina.

4.5.3. N-aminossolúveis

As concentrações de N-aminossolúveis foram determinadas pelo método de Yemm e Cocking (1955), o qual tem como base a reação dos grupos aminos livres com a ninhidrina. Em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, foram adicionados 0,5 mL do suco celular convenientemente diluído, 0,25 mL do tampão citrato de sódio 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% também em metilcelosolve a 100%. Após agitação, os tubos fechados com tampas foram deixados em banho-maria a 100°C, por 15 min. Em seguida, interrompeu-se a reação por meio de resfriamento dos tubos em banho de gelo e foram adicionados 0,65 mL de etanol a 60%. O branco constituiu-se da mistura formada por 0,5 mL de água desionizada acrescidos dos

demais constituintes da reação. Os N-aminossolúveis foram quantificados por medidas de absorvância em 570 nm, usando-se como padrão uma curva feita com L-glicina.

4.5.4. Prolina

As concentrações de prolina foram determinadas de acordo com o método de Bates *et al.* (1973), que tem como base a reação com a solução de ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina, em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico a 6,0 M). Em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, foram adicionados 1,0 mL do suco celular apropriadamente diluído, 1,0 mL de ninhidrina ácida e 1,0 mL de ácido acético glacial, sendo a mistura aquecida a 100°C, por 1 h, para o desenvolvimento da cor. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 10 min para interromper a reação. Após o resfriamento, adicionaram-se 2,0 mL de tolueno aos tubos, os quais foram agitados vigorosamente e deixados em repouso. Após repouso e formação de uma mistura bifásica, a fase superior (cromóforo + tolueno) foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur para quantificação de prolina, o que foi feito através de leituras de absorvância em 520 nm, sendo o tolueno usado como branco. Utilizou-se como padrão uma curva feita com L-prolina.

Os teores de proteína foram expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e os dos solutos orgânicos em mM e representam a média de cinco repetições, sendo cada repetição dosada em duplicata.

4.6. Teores relativos de clorofila e emissão de fluorescência pela clorofila *a*

Os teores relativos de clorofila foram determinados no dia anterior ao da coleta, por meio de método não-destrutivo, através de leituras realizadas com um medidor de clorofila portátil (SPAD-502, Minota Co.Ltd Osaka, Japan), nas mesmas folhas utilizadas para a determinação do Ψ_s (2ª folha completamente expandida, a partir da base). Em cada planta

foram realizadas três leituras e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias, fornecidas pelo próprio aparelho.

A emissão de fluorescência da clorofila *a* foi medida entre 10 e 12 h, na segunda folha completamente expandida, a partir da base, após 30 min de adaptação das folhas ao escuro, com um fluorímetro portátil Handy PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK), sendo determinados os seguintes parâmetros: fluorescência inicial (F_o), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (F_v). A eficiência fotoquímica do fotossistema II, foi estimada pela relação F_v/F_m .

4.7. Peroxidação de lipídios de membrana

Para a mensuração da peroxidação dos lipídios de membrana, foi utilizado o teste para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico proposto por Cakmak e Horst (1991), que determina o teor de malondialdeído (MDA) como um produto da peroxidação de lipídios.

Os extratos foram preparados a partir da maceração, por 3 min, de 1 g de tecido fresco das folhas em 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a 15.000 x g, durante 10 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4°C e o sobrenadante (extrato) foi armazenado a -25°C até o momento das análises.

A reação ocorreu a partir da adição de 0,5 mL do extrato a 1,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,5% em TCA a 20%. A mistura foi incubada em banho-maria a 90°C, por 20 min, sendo a reação, interrompida por meio de resfriamento dos tubos em banho de gelo. A amostra foi então centrifugada a 10.000 x g, por 5 min, e o sobrenadante foi coletado para a determinação das leituras a 532 nm e a 660 nm. Os teores de MDA foram estimados

através da subtração dessas leituras, utilizando-se seu coeficiente de extinção molar ($155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressos em $\text{nmol g}^{-1} \text{ MF}$.

4.8. Atividade das enzimas do estresse oxidativo

4.8.1. Preparação dos extratos de folhas e raízes

O extrato base para determinação das atividades enzimáticas foi obtido a partir da maceração, em almofariz, de 1 g do tecido fresco de folhas e de raízes em 4,0 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM e ascorbato a 2 mM. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a $12.000 \times g$, durante 15 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4°C e o sobrenadante (extrato) foi armazenado a -25°C até o momento das análises.

4.8.2. Dismutase do superóxido

A atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com o método de Beauchamp e Fridovich (1971). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8, EDTA a 0,1 mM, metionina a 19,5 mM, azul de *p*-nitrobluetetrazólio (NBT) a $75 \mu\text{M}$, riboflavina a $2 \mu\text{M}$ e 50 μL do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A reação foi conduzida a 25°C em uma câmara de reação revestida internamente com papel alumínio e iluminada com duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, por 15 min (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A atividade enzimática foi estimada através do aumento da absorbância em 560 nm, devido à produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT. Os resultados foram expressos em $\text{UA g}^{-1} \text{ MF}$, sendo uma UA (unidade de atividade enzimática) definida como sendo a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da fotorredução do NBT, no período de 15 min.

4.8.3. Catalase

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com Haver e McHale (1987). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 86 mM, pH 7,0, EDTA a 86 μ M, H₂O₂ a 20 mM e 150 μ L do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância em 240 nm, devido ao consumo de H₂O₂. Os resultados foram expressos em μ mol H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ MF usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (36 M⁻¹ cm⁻¹).

4.8.4. Peroxidase do ascorbato

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 36,7 mM, pH 6,0, EDTA a 36,7 μ M, ascorbato a 0,5 mM, H₂O₂ a 1 mM e 300 μ L do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. Determinou-se a atividade da enzima pela oxidação do ascorbato, medida pelo decréscimo na absorbância em 290 nm. Os resultados foram expressos em μ mol H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ MF, usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ para o ascorbato e a estequiometria da reação (dois moles de ascorbato para um mol de H₂O₂).

4.8.5. Peroxidase do guaiacol

A atividade da peroxidase do guaiacol (GPX, EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 47,5 mM, pH 6,0, EDTA a 47,5 μ M, guaiacol a 5 mM, H₂O₂ a 15 mM e 50 μ L do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 2,0 mL. A reação foi acompanhada pelo incremento da absorbância em 420 nm, devido à formação do

tetraguaiacol. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do tetraguaicol ($26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a estequiometria da reação (cada mol de tetraguaiacol envolve o consumo de quatro moles de H_2O_2).

As atividades enzimáticas representam a média de cinco repetições, sendo cada repetição dosada em duplicata.

4.9. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram efetuadas utilizando-se o programa estatístico SigmaStat[®], versão 3.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do crescimento

No presente estudo, plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo foram submetidas a três tratamentos salinos, via solução nutritiva, durante 25 dias. A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 1 mostra que as variáveis AF, MSPA, MSR e relação MSPA/MSR foram afetadas significativamente pelos tratamentos. O efeito significativo na interação entre os fatores espécie e tratamento para as variáveis MSPA, MSR e relação MSPA/MSR indica que esses parâmetros foram afetados de forma diferente pelos tratamentos, sendo esse efeito significativamente dependente da espécie. Em relação à AF, não houve interação entre espécie e tratamento, indicando que a inibição do crescimento foliar nas três espécies apresentou comportamento distinto em relação aos tratamentos salinos aplicados.

Tabela 1 – Análise de variância (valores F) para os dados de área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) e relação entre massa seca da parte aérea e das raízes (MSPA/MSR) de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de 0,9 dS m^{-1} de CE (baixa salinidade) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de 4,0 (média salinidade) e 8,0 dS m^{-1} (alta salinidade). Diferenças significativas são representadas por (***) , (**) e (*) para $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$, respectivamente. (ns) = não significativo

Fonte de variação	AF	MSPA	MSR	MSPA/MSR
Espécie (E)	38,02***	49,11***	62,28***	96,98***
Tratamento (T)	18,21***	34,33***	8,34***	14,72***
Interação T x E	0,62 ^{ns}	5,28**	3,38*	8,80***

Na Figura 1, pode ser observado que o estresse salino causou inibição significativa na AF das três espécies. A AF das plantas de feijão-de-corda foi a mais afetada pelos tratamentos

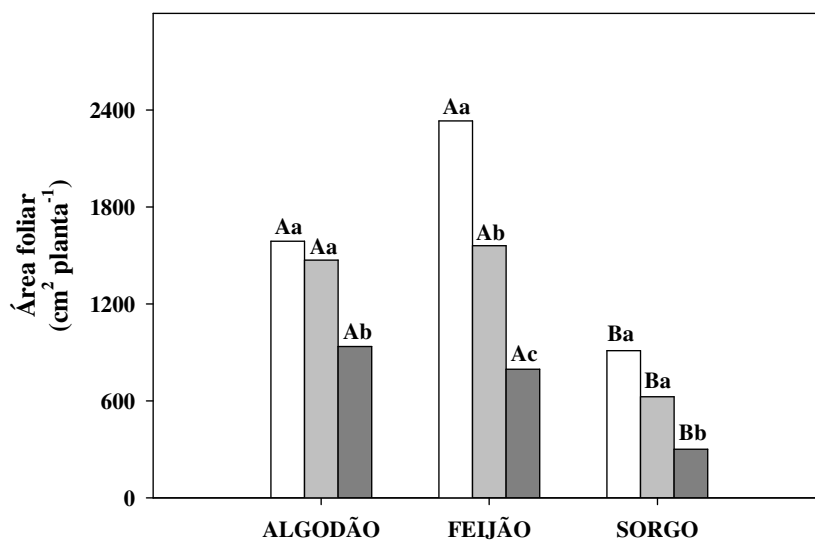


Figura 1. Área foliar de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de $0,9 \text{ dS m}^{-1}$ de CE (baixa salinidade - □) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de $4,0$ (média salinidade - ■) e $8,0 \text{ dS m}^{-1}$ (alta salinidade - ■). Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento e com mesmas letras minúsculas em uma mesma espécie não são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.

salinos apresentando reduções de 33 e 66% para os níveis de média ($4,0 \text{ dS m}^{-1}$) e alta salinidade ($8,0 \text{ dS m}^{-1}$), respectivamente, em relação ao nível de mais baixa salinidade ($0,9 \text{ dS m}^{-1}$). As plantas de sorgo e algodão somente apresentaram reduções na AF no nível de mais alta salinidade com reduções de 67 e 41%, respectivamente, em relação ao nível de mais baixa salinidade.

De acordo com Munns e Tester (2008), a redução na AF é um importante mecanismo adaptativo das plantas cultivadas sob estresse salino e hídrico, visto que sob tais condições esta redução diminui o fluxo transpiratório e, conseqüentemente, o carregamento de sais através do xilema, mantendo, assim, a água em seus tecidos. Reduções na área foliar foram observadas em várias espécies vegetais submetidas ao estresse salino, tais como bananeira (NEVES *et al.*, 2002), algodão (JÁCOME *et al.*, 2003), feijão (COSTA *et al.*, 2003), sorgo (LACERDA *et al.*, 2003a), milho (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004) e maracujazeiro (CRUZ *et al.*, 2006).

As massas secas da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR), assim como a relação entre esses dois parâmetros (MSPA/MSR) das três espécies estudadas estão apresentadas na Figura 2. Nas plantas de algodão e sorgo expostas a um nível moderado de salinidade ($4,0 \text{ dS m}^{-1}$), não ocorreu redução significativa da MSPA quando comparada com as plantas do tratamento de baixo nível de salinidade ($0,9 \text{ dS m}^{-1}$). Contudo, foram observadas reduções de 41 e 58% para as duas espécies, respectivamente, na concentração mais elevada de sal ($8,0 \text{ dS m}^{-1}$). Já no feijão-de-corda, esse parâmetro foi afetado significativamente a partir do nível moderado de salinidade, o qual não diferiu daquele de mais alta salinidade, com redução média de 50% nesses dois níveis de salinidade, em relação às plantas do tratamento a $0,9 \text{ dS m}^{-1}$ (Figura 2A). Enquanto no algodão e no feijão-de-corda a salinidade não ocasionou alterações significativas na MSR, no sorgo houve uma redução significativa nessa variável a $8,0 \text{ dS m}^{-1}$ em relação às

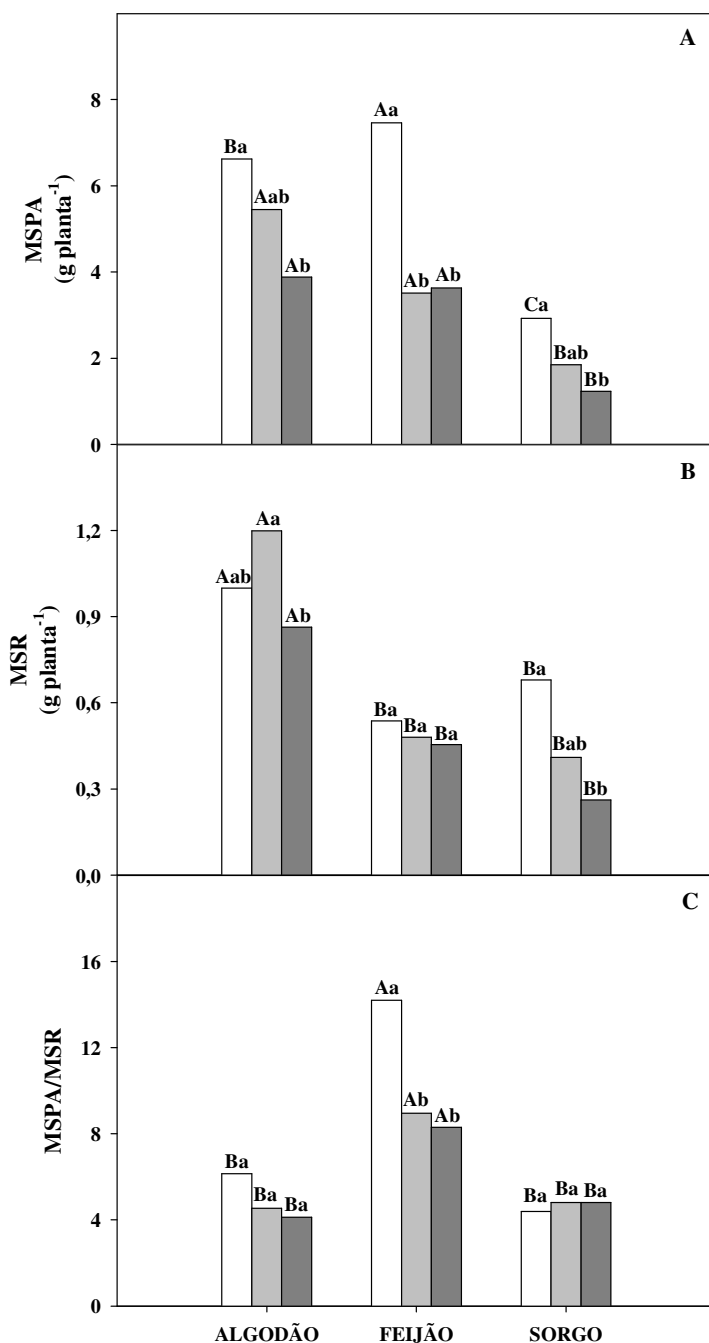


Figura 2. Massa seca da parte aérea (MSPA, A), da raiz (MSR, B) e relação entre massa seca da parte aérea e raiz (MSPA/MSR, C) de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de $0,9 \text{ dS m}^{-1}$ de CE (baixa salinidade - □) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de $4,0$ (média salinidade - ▒) e $8,0 \text{ dS m}^{-1}$ (alta salinidade - ■). Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento e com mesmas letras minúsculas em uma mesma espécie não são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.

plantas a baixo nível de salinidade. No algodão, a MSR no nível moderado de salinidade foi 34% maior que a 8,0 dS m⁻¹ (Figura 2B). Nas plantas de algodão e sorgo, a relação MSPA/MSR não diferiu estatisticamente entre os três tratamentos, contudo, essa relação foi significativamente reduzida no feijão-de-corda, nos tratamentos a 4,0 dS m⁻¹ e 8,0 dS m⁻¹, cerca de 39% (Figura 2C).

De acordo com Munns (2002) e Munns e Tester (2008), apesar de a raiz ser um órgão da planta que está diretamente exposto ao estresse, ela é menos vulnerável aos sais do que a parte aérea, devido provavelmente a mecanismos mais eficientes de ajustamento osmótico.

5.2. Potencial osmótico e teor relativo de água

O potencial osmótico (Ψ_s) de folhas e raízes sofreu influência dos fatores espécie e tratamento, bem como houve interação entre ambos (Tabela 2). Isso indica que os tratamentos salinos exerceram efeito diferenciado no Ψ_s , dependendo da espécie considerada. Contudo, para o teor relativo de água (TRA), nenhuma significância foi observada nesse parâmetro.

Tabela 2 - Análise de variância (valores F) para os dados de potencial osmótico (Ψ_s) de folhas e raízes e para o teor relativo de água de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland ½ de 0,9 dS m⁻¹ de CE (baixo nível de sal) e solução nutritiva de Hoagland ½ adicionada de sal, com CE de 4,0 (médio nível de sal) e 8,0 dS m⁻¹ (alto nível de sal). Diferenças significativas são representadas por (***) e (**) para $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,01$, respectivamente. (ns) = não significativo.

Fontes de variação	Ψ_s		TRA
	Folhas	Raízes	
Espécie (E)	199,11 ***	44,69 ***	0,76 ^{ns}
Tratamento (T)	94,76 ***	22,74 ***	0,87 ^{ns}
Interação (T x E)	10,07 ***	4,01 **	2,62 ^{ns}

Os efeitos da salinidade sobre o potencial osmótico em folhas e raízes das três espécies aqui estudadas são apresentados na Figura 3. A diminuição do Ψ_s foliar, em relação ao tratamento a $0,9 \text{ dS m}^{-1}$, só foi observada no tratamento salino a $8,0 \text{ dS m}^{-1}$, sendo essas reduções de 53, 41 e 18% respectivamente, para o algodão, feijão-de-corda e sorgo (Figura 3A). Já para as raízes, as três espécies apresentaram respostas diferenciadas. Em relação ao tratamento de baixo nível de salinidade, o algodão decresceu seu Ψ_s em 24 e 55%, respectivamente, para os níveis moderado e de alta salinidade; o feijão-de-corda em aproximadamente 53% para ambos os tratamentos salinos (média e alta salinidade), enquanto para o sorgo não foram observadas alterações significativas nessa variável em nenhum dos tratamentos (Figura 3B). É interessante ressaltar que das três espécies estudadas, o algodão foi àquela que sob condições de média e alta salinidade, apresentou maiores reduções tanto no Ψ_s foliar quanto no radicular. Segundo diferentes autores (BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000; MARTÍNEZ-BALLESTA; MARTÍNEZ; CARVAJAL, 2004), a redução do Ψ_s foliar em plantas sob estresse salino com NaCl tem como principal causa a absorção dos íons Na^+ e Cl^- , em associação com diferentes classes de solutos orgânicos que são acumulados e contribuem para o ajustamento osmótico.

Diferentemente do Ψ_s foliar, o teor relativo de água (TRA) nas folhas não foi afetado pela salinidade (Figura 3C). Além disso, não foram observadas diferenças significativas nos valores de TRA para as três espécies estudadas, as quais atingiram valores médios em torno de 80%. Outros autores utilizando níveis de estresse semelhantes aos aqui usados, também observaram que o TRA não foi alterado pelo estresse salino (PIZARRO, 2006; CAMARGO *et al.*, 2008; FERREIRA-SILVA, 2008), sugerindo que as plantas desenvolvem efetivos mecanismos de ajustamento osmótico para regular sua homeostase hídrica a valores similares àqueles das plantas controle, através da compartimentagem dos íons Na^+ e Cl^- no vacúolo ou pela síntese de solutos orgânicos no citosol.

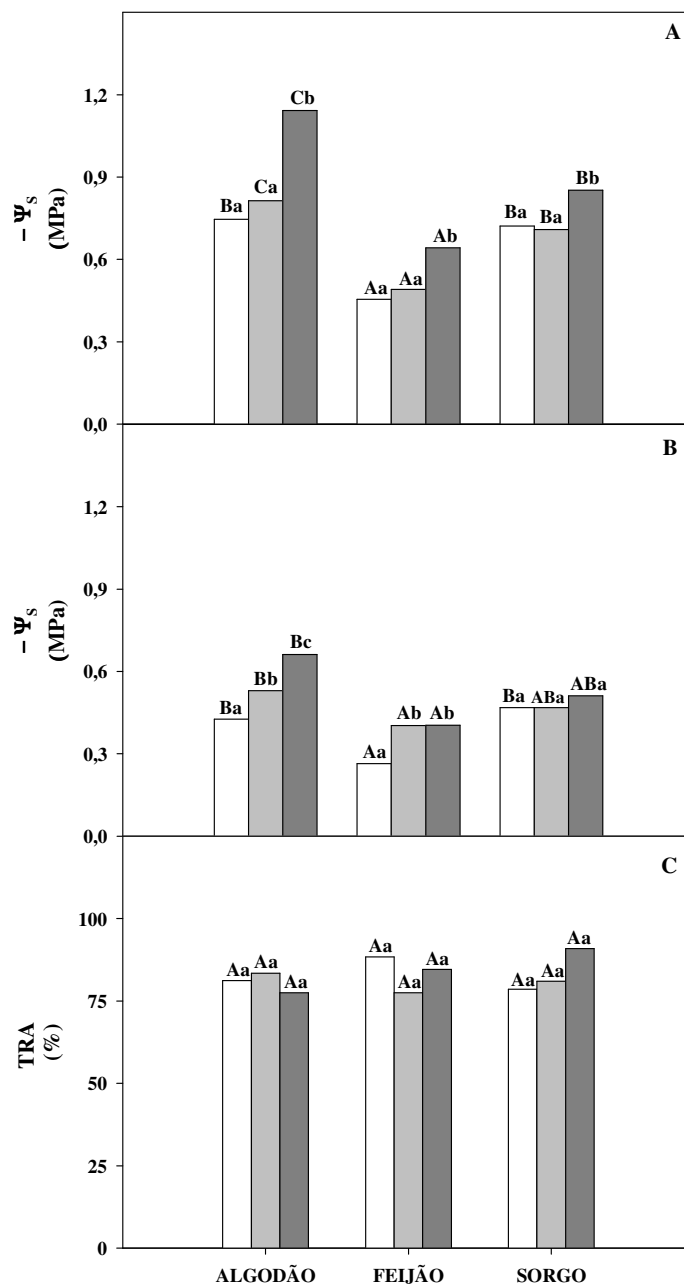


Figura 3. Potencial osmótico (Ψ_s) em folhas (A) e raízes (B) e teor relativo de água (TRA) foliar (C) de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de $0,9 \text{ dS m}^{-1}$ de CE (baixa salinidade - □) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de $4,0$ (média salinidade - ■) e $8,0 \text{ dS m}^{-1}$ (alta salinidade - ■). Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento e com mesmas letras minúsculas em uma mesma espécie não são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.

É importante ressaltar que para todas as espécies analisadas nos diferentes tratamentos, observou-se que o Ψ_s foliar foi sempre menor do que aquele das raízes. Isto pode sugerir um ajustamento osmótico efetivo das diferentes partes da planta, capaz de manter o gradiente de potencial hídrico e o *status* hídrico do tecido foliar sob condições de salinidade, o que pôde ser comprovado pela inalterabilidade do TRA foliar nas três espécies estudadas (Figura 3).

5.3. Solutos inorgânicos em folhas e raízes

As concentrações dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e NO_3^- em folhas e raízes das três espécies estudadas, sofreram influência dos fatores tratamento e espécie, bem como houve interação entre ambos (Tabela 3). Isso indica que os valores dos íons nas folhas e raízes acumulados nas plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo foram afetados de forma diferente pelos tratamentos salinos, sendo esse efeito significativamente dependente da espécie.

Comparando-se as três espécies, observa-se que o algodão foi aquele que apresentou as maiores diferenças entre os tratamentos controle ($0,9 \text{ dS m}^{-1}$) e salinos ($4,0$ e $8,0 \text{ dS m}^{-1}$), acumulando maior quantidade de Na^+ em suas folhas e raízes, com aumentos de 32,7 vezes para as folhas e 46,4 vezes para as raízes, no mais alto nível de salinidade, em comparação ao de mais baixo nível de salinidade (Tabela 4).

Diferentemente do algodoeiro, a acumulação de Na^+ nas folhas de feijão-de-corda só mostrou diferença significativa a $8,0 \text{ dS m}^{-1}$, com aumentos de 4,4 vezes em relação ao tratamento controle. Já nas raízes dessa mesma espécie, os aumentos foram graduais com a intensificação do estresse, sendo observado no tratamento intermediário de salinidade um aumento de 24,1 vezes, enquanto que, no mais alto nível de salinidade, esse aumento foi de 26,9 vezes (Tabela 4). Para o sorgo, o acúmulo de Na^+ nas folhas ocorreu de forma gradual com a intensificação da salinidade alcançando valores de 2,9 e 20,6 vezes maiores, nos tratamentos a $4,0$ e $8,0 \text{ dS m}^{-1}$, respectivamente, em relação ao tratamento a $0,9 \text{ dS m}^{-1}$. Já nas

Tabela 3 - Análise de variância (valores F) para os dados de concentração dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e NO_3^- de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de $0,9 \text{ dS m}^{-1}$ de CE (baixo nível de sal) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de $4,0$ (médio nível de sal) e $8,0 \text{ dS m}^{-1}$ (alto nível de sal). Diferenças significativas são representadas por (***) e (*) para $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,05$, respectivamente.

Fontes de variação	FOLHAS				RAÍZES			
	Na^+	K^+	Cl^-	NO_3^-	Na^+	K^+	Cl^-	NO_3^-
Espécie (E)	2,67*	155,82***	465,32***	126,97***	21,53***	1407,48***	1509,23***	109,11*
Tratamento (T)	2,67*	21,46***	849,31***	295,72***	12451,88***	51,37***	579,34***	139,61*
Interação (T x E)	2,67*	32,47***	54,61***	67,74***	292,85***	26,38***	18,35***	70,56*

Tabela 4 - Concentração de íons Na^+ , K^+ , Cl^- e NO_3^- em folhas e raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de 0,9 dS m^{-1} de CE (baixo nível de sal) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de 4,0 (médio nível de sal) e 8,0 dS m^{-1} (alto nível de sal). Médias dentro da mesma coluna, seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, para as diferentes espécies dentro de um mesmo tratamento, ou médias dentro da mesma coluna, seguidas pelas mesmas letras minúsculas, para uma determinada espécie, não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Espécie	Tratamento (dS m^{-1})	Folhas (mM)			
		Na^+	K^+	Cl^-	NO_3^-
Algodão	0,9	3,41 Ac	176,13 Ab	45,27 Ab	68,42 Ba
	4,0	59,16 Ab	168,45 Ab	206,87 Aa	40,67 Bb
	8,0	114,84 Aa	194,56 Aa	217,24 Aa	16,46 Cc
Feijão	0,9	3,78 Ab	117,96 Bb	50,63 Ac	58,01 Ca
	4,0	4,80 Cb	118,78 Cb	118,30 Bb	53,38 Aa
	8,0	20,36 Ca	158,92 Ba	206,92 Aa	56,55 Aa
Sorgo	0,9	3,38 Ac	163,84 Aa	21,75 Bb	98,98 Aa
	4,0	13,05 Bb	145,00 Bb	73,36 Ca	53,86 Ab
	8,0	73,08 Ba	132,30 Cc	74,47 Ba	45,50 Bc
Raízes (mM)					
Algodão	0,9	2,85 Cc	152,78 Aa	40,63 Bb	81,53 Aa
	4,0	53,24 Cb	127,80 Bb	156,72 Aa	29,64 Bb
	8,0	135,20 Aa	126,16 Bb	183,27 Aa	30,43 Ab
Feijão	0,9	3,48 Bc	78,72 Ba	52,48 Ab	35,05 Ba
	4,0	87,44 Ab	62,98 Cb	118,41 Ba	24,29 Bb
	8,0	97,22 Ba	62,21 Cb	121,44 Ba	16,31 Bc
Sorgo	0,9	7,24 Ab	156,47 Ab	6,05 Cc	41,59 Bb
	4,0	61,60 Ba	184,32 Aa	17,26 Cb	50,30 Aa
	8,0	66,82 Ca	143,36 Ab	27,95 Ca	35,18 Ab

raízes, esse aumento apresentou valor médio de 7,9 vezes no tratamento intermediário e de alta salinidade em relação ao tratamento de baixa salinidade (Tabela 4).

Em nossas condições experimentais, o algodão foi aquele que mais acumulou Na^+ nas folhas, seguido pelo sorgo e feijão-de-corda. Já nas raízes, os maiores acúmulos foram encontrados no algodão, seguido pelo feijão-de-corda e sorgo. Outros autores (MÜHLING; LÄUCHLI, 2002; SOUSA, 2007) também encontraram maiores acúmulos de Na^+ em folhas de algodoeiro em estudos comparativos com outras espécies consideradas sensíveis ao estresse salino. Isso pode sugerir que a tolerância do algodoeiro à salinidade não está necessariamente associada à exclusão de Na^+ dos tecidos fotossintetizantes, como ocorre com outras espécies de glicófitas (LACERDA *et al.*, 2003a). Sorgo e feijão-de-corda concentraram maiores quantidades de Na^+ nas raízes, em detrimento da folhas. Segundo Greenway e Munns (1980), Munns (2002) e Munns e Tester (2008), a habilidade das plantas em limitar a absorção e/ou transporte de íons da zona radicular para a parte aérea, evitando assim a sua acumulação em níveis que excedam a habilidade das células em compartimentá-los no vacúolo, constitui-se em um mecanismo de tolerância à salinidade em glicófitas.

As concentrações de K^+ diferiram entre as espécies e entre folhas e raízes, e quando submetidas aos tratamentos salinos, as espécies apresentaram respostas diferenciadas. Para o algodão e o feijão-de-corda, a dose de sal intermediária não alterou significativamente a concentração de K^+ nas folhas, embora na dose mais elevada tenha ocorrido um aumento nos níveis desse íon para ambas as espécies de 10,5 e 34,7%, respectivamente (Tabela 4). Já nas raízes, as concentrações de K^+ sofreram reduções médias de 16,9% para o algodão e 20,5% para o feijão-de-corda em ambos os tratamentos salinos a 4,0 e 8,0 dS m^{-1} , respectivamente, quando comparados com o controle (Tabela 4). As reduções desse soluto nas raízes podem sugerir uma maior translocação desse íon essencial para as folhas, a fim de assegurar um

melhor ajustamento osmótico das mesmas, além de manter a capacidade fotossintética por sua importância na síntese de proteínas e ativação enzimática (TAIZ; ZEIGER, 2004). Para o sorgo, a concentração de K^+ nas folhas diminuiu com a intensificação do estresse salino, com reduções, em relação ao controle, de 11,5% a 4,0 dS m^{-1} e de 19,3% a 8,0 dS m^{-1} . Já nas raízes, no tratamento a 4,0 dS m^{-1} houve aumento de 17,8%, enquanto que a 8,0 dS m^{-1} a salinidade não alterou os níveis de K^+ , quando comparados com o tratamento a 0,9 dS m^{-1} (Tabela 4). Diminuições nos níveis de potássio em plantas de sorgo submetidas a condições salinas têm sido relatadas por vários autores (LACERDA, 2000; SILVA *et al.*, 2003a; NETONDO; ONYANGO; BECK, 2004; SOUSA, 2007), e atribuídas às elevadas concentrações de sódio através do antagonismo que existe entre esses dois íons, já que o Na^+ também pode entrar nas células radiculares por intermédio de carregadores de K^+ de baixa e alta afinidade (HASEGAWA; BRESSAN, 2000; APSE; BLUMWALD, 2002).

As concentrações de Cl^- aumentaram de forma significativa nas plantas das três espécies estudadas, sendo que para as folhas do algodão e do sorgo foram observados valores de 3,6 e 2,4 vezes aqueles dos respectivos controles, no nível moderado de salinidade (Tabela 4). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações desse íon nos tratamentos de alta e moderada salinidade. Para o feijão-de-corda, o aumento aconteceu de forma gradual, sendo observado valores de 1,3 e 3,1 vezes aqueles dos respectivos controles para os tratamentos a 4,0 e 8,0 dS m^{-1} (Tabela 4). Nas raízes das plantas de algodão e feijão-de-corda, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de Cl^- a 4,0 e 8,0 dS m^{-1} , as quais foram em média, respectivamente 3,2 e 1,3 vezes maiores que aquelas dos respectivos controles. Para o sorgo, os aumentos nas raízes foram de 1,9 e 3,6 vezes, nos níveis intermediário e mais alto de salinidade, respectivamente (Tabela 4). Similarmente ao que aconteceu para o Na^+ , os maiores acúmulos de Cl^- ocorreram nas plantas de algodão, seja nas folhas ou nas raízes. Resultados similares foram encontrados por SOUSA (2007) em um

estudo comparativo entre essas três espécies, no qual as concentrações de Cl^- foram maiores nas folhas do algodão seguidas daquelas do feijão-de-corda. Esse autor sugere que esses aumentos favorecem a manutenção da absorção de água pela planta, com conseqüente manutenção do seu grau de suculência. Deve-se ressaltar, também, que embora os aumentos nas concentrações de Cl^- nas folhas e raízes das três espécies estudadas, em relação aos controles, tenham sido bastante acentuados pela salinidade, os aumentos nas concentrações de Na^+ foram superiores aos aumentos nas concentrações de Cl^- (Tabela 4). Resultados semelhantes para plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, foram encontrados anteriormente por outros autores (COSTA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003b; AKHTAR *et al.*, 2005).

A concentração de NO_3^- , nas folhas de feijoeiro, não foi alterada pelos tratamentos salinos, enquanto que para o algodão e o sorgo, observaram-se reduções graduais com a intensificação do estresse (Tabela 4). Nas raízes, as respostas foram bastante diversas. O algodão reduziu, em média, 63,2% a concentração de NO_3^- , nos tratamentos salinos a 4,0 e 8,0 dS m^{-1} . Já no feijão-de-corda foram observadas reduções de 30,7 e 53,5%, nos níveis intermediário e de mais alta salinidade, respectivamente. Nas raízes do sorgo, não houve diferenças nas concentrações de NO_3^- entre os tratamentos a 0,9 dS m^{-1} e a 8,0 dS m^{-1} , porém foram observados aumentos nas concentrações desse íon no nível intermediário de salinidade, correspondendo a um aumento de 20,9% em relação ao controle (Tabela 4). O nitrato é um dos elementos essenciais à planta, estando envolvido no crescimento e desenvolvimento das plantas, já que participa da constituição de muitas biomoléculas tais como proteínas, ácidos nucléicos, aminoácidos, coenzimas, vitaminas e pigmentos (DUBEY; PESSARAKLI, 1994). As plantas requerem nitrogênio em altas concentrações e sua deficiência inibe rapidamente o crescimento vegetal e, conseqüentemente, sua produção (DUBEY; PESSARAKLI, 1994; TAIZ; ZEIGER, 2004). Resultados obtidos com diferentes espécies mostram que a salinidade

pode reduzir, aumentar ou não alterar os teores de N nos tecidos das plantas (MELONI *et al.*, 2004; MONTE *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2006).

5.4. Solutos orgânicos em folhas

A Tabela 5 mostra o resumo da análise de variância para os solutos orgânicos nas folhas das três espécies. Verifica-se que houve diferença significativa entre as espécies e os tratamentos, bem como houve interação entre essas duas fontes de variação.

Tabela 5 - Análise de variância (valores *F*) para os dados de concentração de carboidratos solúveis, proteína solúvel, N-aminossolúvel e prolina em folhas de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland ½ de 0,9 dS m⁻¹ de CE (baixo nível de sal) e solução nutritiva de Hoagland ½ adicionada de sal, com CE de 4,0 (médio nível de sal) e 8,0 dS m⁻¹ (alto nível de sal). Diferenças significativas são representadas por (***) e (**) para $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,01$, respectivamente.

Fontes de variação	Carboidratos solúveis	Proteína solúvel	N-aminossolúvel	Prolina
Espécie (E)	840,12 ^{***}	123,49 ^{***}	1218,91 ^{***}	23,81 ^{***}
Tratamento (T)	353,38 ^{***}	56,79 ^{***}	96,78 ^{***}	88,29 ^{***}
Interação (T x E)	156,50 ^{***}	10,35 ^{***}	10,62 ^{***}	4,74 ^{**}

A salinidade induziu aumento na concentração foliar de carboidratos solúveis nas plantas de feijão-de-corda e sorgo, sendo que esses aumentos se deram gradativamente com a intensificação do estresse (Tabela 6). Em relação ao controle (0,9 dS m⁻¹), os aumentos foram de 10,1% a 4,0 dS m⁻¹ e 51,0% a 8,0 dS m⁻¹, para o feijão-de-corda, enquanto para o sorgo os aumentos foram de 60,7% a 4,0 dS m⁻¹ e 119,0% a 8,0 dS m⁻¹ (Tabela 6). O aumento na concentração de solutos orgânicos no citoplasma de plantas submetidas a estresse salino tem sido considerado como um mecanismo utilizado pelas plantas para balancear o potencial osmótico entre o citoplasma e o vacúolo e evitar danos aos sistemas enzimáticos (MUNNS,

Tabela 6 - Concentração de carboidratos solúveis, proteína solúvel, N-aminossolúveis e prolina em folhas de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland ½ de 0,9 dS m⁻¹ de CE (baixo nível de sal) e solução nutritiva de Hoagland ½ adicionada de sal, com CE de 4,0 (médio nível de sal) e 8,0 dS m⁻¹ (alto nível de sal). Médias dentro da mesma coluna, seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, para as diferentes espécies dentro de um mesmo tratamento, ou médias dentro da mesma coluna, seguidas pelas mesmas letras minúsculas, para uma determinada espécie, não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Espécie	Tratamento (dS m ⁻¹)	Carboidratos solúveis (mM)	Proteína solúvel (µg mL ⁻¹)	N-aminossolúveis (mM)	Prolina (mM)
Algodão	0,9	27,33 Ca	8,61 Ba	8,37 Cb	2,04 Bb
	4,0	18,64 Cc	6,59 Bb	11,44 Ca	1,97 Bb
	8,0	24,14 Cb	6,50 Bb	12,15 Ca	2,60 Ba
Feijão	0,9	35,74 Ac	9,47 Aa	28,77 Ac	1,92 Bb
	4,0	39,35 Bb	9,49 Aa	32,88 Ab	2,11 Bb
	8,0	53,96 Ba	8,87 Aa	41,85 Aa	3,18 Aa
Sorgo	0,9	31,54 Bc	8,36 Ba	17,21 Bb	2,39 Ab
	4,0	50,69 Ab	6,17 Bb	16,44 Bb	2,56 Ab
	8,0	69,21 Aa	6,44 Bb	21,87 Ba	3,19 Aa

2002), como também tem sido observado por outros autores (OLIVEIRA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003a). Por outro lado, para o algodão, foram observadas, em relação ao controle ($0,9 \text{ dS m}^{-1}$), reduções de 31,8 e 11,7% para os tratamentos intermediário e de mais alto nível de salinidade, respectivamente (Tabela 6), fato que sugere que os carboidratos solúveis tem pouca influência no ajustamento osmótico desta espécie, diferentemente do observado para o sorgo e o feijão-de-corda. Azevedo Neto (2005) estudando dois genótipos de milho com tolerância diferenciada ao estresse salino observou que as concentrações de carboidratos solúveis permaneceram constantes no genótipo tolerante, enquanto que, diminuíram no sensível, evidenciando que não existe um consenso acerca do papel dos carboidratos na tolerância a salinidade. Segundo, Ashraf e Harris (2004), o papel dos açúcares na adaptação de plantas às condições salinas não pode ser considerado um parâmetro universal para a definição de espécies que apresentam tolerância ao sal.

A concentração de proteína solúvel não foi afetada pela salinidade, no feijão-de-corda, enquanto no sorgo e algodão a salinidade ocasionou reduções médias de 24,5 e 24,0%, respectivamente, nos tratamentos a média e alta salinidade, em relação aos respectivos controles (Tabela 6). O estresse salino pode ocasionar alterações metabólicas que levam a mudanças no conteúdo de proteínas, as quais ocorrem em função de alterações nas taxas de síntese e/ou degradação, sendo um dos processos associados com a susceptibilidade ou tolerância à salinidade (MANSOUR, 2000). O decréscimo no conteúdo de proteína pode ser devido ao retardamento na síntese protéica ou na aceleração de sua degradação, levando ao aumento na quantidade de aminoácidos livres ou à inibição da incorporação destes aminoácidos nas proteínas.

Costa *et al.* (2003), estudando dois cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos a 75 mM de NaCl, observaram que os teores de proteínas solúveis em folhas e raízes não foram

alterados significativamente entre os tratamentos controle e salino. Resultados semelhantes foram encontrados em outras espécies como sorgo e cajueiro anão-precoce (CAMARGO *et al.*, 2008; FERREIRA-SILVA, 2008). Contudo, deve-se ressaltar que existem estudos que mostram que os teores de proteínas solúveis aumentam com a salinidade. Por exemplo, Oliveira *et al.* (2006), observaram que aumentos nos teores de proteínas, no tecido foliar de sorgo forrageiro, foram proporcionais aos teores de sal no meio de cultivo e variaram com o genótipo estudado.

A salinidade afetou a concentração de N-aminossolúveis nas três espécies estudadas. O algodoeiro foi a espécie que apresentou a menor concentração desse soluto nas folhas, embora tenha tido aumentos médios de 40,9% para os tratamentos de média e alta salinidade, quando comparados com as plantas controle (Tabela 6). O sorgo apresentou concentrações intermediárias entre as duas outras espécies, apresentando aumento de 27,1% devido à salinidade, em relação ao controle, somente para o tratamento de mais alta salinidade (Tabela 6). Já o feijão-de-corda foi à espécie com a maior concentração de N-aminossolúveis, tendo apresentado aumentos de 14,3 e 45,5% respectivamente, nos tratamentos a 4,0 e 8,0 dS m⁻¹ em relação ao tratamento a 0,9 dS m⁻¹ (Tabela 6).

Os aumentos na concentração de N-aminossolúveis nas plantas de algodão e sorgo podem ser correlacionados com a hidrólise ou inibição da síntese protéica pela salinidade nessas duas espécies (Tabela 6), desde que houve diminuição na concentração de proteína com o aumento da salinidade. Já para o feijão-de-corda, cuja concentração de proteína não foi afetada pela salinidade, não pôde ser feita essa correlação, podendo-se inferir, contudo, que os aumentos nas concentrações de N-aminossolúveis nesta espécie podem ser resultado de outros fatores, como por exemplo, redução na exportação de aminoácidos e amidas das folhas para outras partes das plantas (TULLY; HANSON; NELSEN, 1979).

A concentração de prolina não diferiu entre o tratamento controle e o tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹, para todas as espécies estudadas. Contudo, esses teores foram aumentados no tratamento salino a 8,0 dS m⁻¹ em 27,5%, 33,5% e 65,6% para algodão, sorgo e feijão-de-corda, respectivamente (Tabela 6). O acúmulo de prolina livre é uma típica resposta das plantas sob condições de estresse salino (DEMIRAL; TÜRKAN, 2005). Embora as funções desempenhadas por esse aminoácido em plantas sujeitas à salinidade permaneçam controversas (DEMIRAL; TÜRKAN, 2005), seu papel osmorregulador e sua contribuição para a estabilidade de membranas celulares e redução dos efeitos do NaCl são bem documentados na literatura (GADALLAH, 1999; MANSOUR, 2000). Entretanto, no presente experimento, é pouco provável que a prolina tenha contribuído de forma significativa no ajustamento osmótico das três espécies aqui estudadas, uma vez que suas concentrações foram bem inferiores às concentrações de carboidratos e N-aminossolúveis, para todas as espécies estudadas (Tabela 6).

É interessante ressaltar que, sob condições controle, o K⁺ foi dentre os solutos analisados aquele que mais contribuiu para os valores de Ψ_s foliar das três espécies estudadas. Deve-se, também, ressaltar que dentre os solutos analisados, os inorgânicos contribuíram muito mais para o abaixamento do Ψ_s em função da salinidade que os orgânicos, desde que o somatório da concentração (em mM) dos íons Na⁺, K⁺, Cl⁻ e NO₃⁻ (Tabela 4) foi bem mais elevado que o somatório das concentrações (em mM) de carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e prolina (Tabela 6).

5.5. Teores relativos de clorofila e emissão de fluorescência da clorofila *a*

O uso de parâmetros de fluorescência, bem como os teores relativos de clorofila (leitura SPAD), permitem avaliar o efeito de vários tipos de estresses sobre a fotossíntese, entre eles a salinidade, a qual reduz a taxa fotossintética e altera o transporte de elétrons,

ocasionando distúrbios dirigidos pela luz via emissão de calor ou fluorescência (KRAUSE; WEIS, 1991).

O resumo da ANOVA apresentado na Tabela 7 mostra que as leituras SPAD e os parâmetros de fluorescência F_o , F_v e a relação F_v/F_m , variaram entre as espécies. Todavia, somente a leitura SPAD foi alterada pelos tratamentos salinos ($p \leq 0,001$). Houve interação significativa entre as fontes de variação (espécie x tratamento) com $p \leq 0,05$, exceto para a variável F_m , cuja interação não foi significativa.

Tabela 7 - Análise de variância (valores F) para os dados de leitura SPAD, fluorescência inicial (F_o), fluorescência máxima (F_m) e relação entre a fluorescência variável e máxima (F_v/F_m) de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de 0,9 dS m^{-1} de CE (baixo nível de sal) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de 4,0 (médio nível de sal) e 8,0 dS m^{-1} (alto nível de sal). Diferenças significativas são representadas por (***) e (*) para $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,05$, respectivamente. (ns) = não significativo.

Fontes de variação	Leitura SPAD	F_o	F_m	F_v/F_m
Espécie (E)	64,96***	27,49***	78,63***	11,39***
Tratamento (T)	9,51***	0,16 ^{ns}	1,32 ^{ns}	1,34 ^{ns}
Interação (T x E)	3,28*	2,81*	1,04 ^{ns}	2,68*

Os valores de F_o e F_m não sofreram alterações com a imposição do estresse salino nas espécies aqui estudadas, porém, variaram entre as espécies estudadas (Figura 4A e B). Com respeito à relação F_v/F_m , os resultados obtidos mostram que não houve nenhuma alteração significativa entre os tratamentos salinos a 4,0 e a 8,0 dS m^{-1} e os respectivos controles, para as plantas de algodão e sorgo. Já para as plantas de feijão-de-corda, observou-se um pequeno acréscimo nessa variável de cerca de 5,0%, em relação ao controle, para a dose de sal mais elevada (Figura 4C).

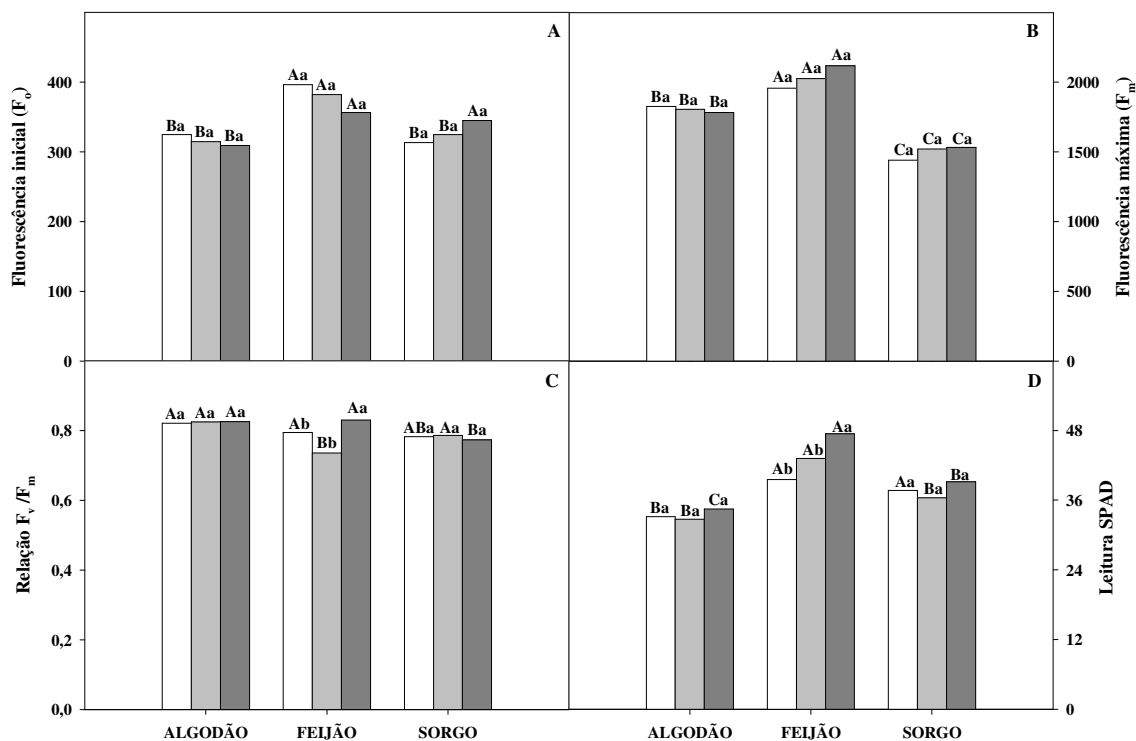


Figura 4. Fluorescência inicial (F_0 , A), fluorescência máxima (F_m , B), relação entre a fluorescência variável e máxima (F_v/F_m , C) e leitura SPAD (D) em plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de $0,9 \text{ dS m}^{-1}$ de CE (baixa salinidade - □) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de $4,0$ (média salinidade - ◻) e $8,0 \text{ dS m}^{-1}$ (alta salinidade - ◼). Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento e com mesmas letras minúsculas em uma mesma espécie não são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

O fato da variável F_o praticamente não ter sido afetada pela salinidade em nenhuma das espécies, sugere que as concentrações dos íons Na^+ e Cl^- nos cloroplastos, não foi suficiente para causar danos físicos no fotossistema II (PS II). Concordando com esse resultado, a relação F_v/F_m , que mede a eficiência fotoquímica do PS II, também praticamente não foi afetada pela salinidade. De acordo com Baker e Rosenqvst (2004), diminuições na relação F_v/F_m associadas com aumentos em F_o indicam danos ao aparelho fotossintético, o que claramente não ocorreu para nenhuma das espécies estudadas, o que demonstra que os níveis de estresse aqui utilizados não foram suficientes para causar danos ao aparato fotossintético. Contudo, deve-se ressaltar que a maioria das espécies apresenta redução na eficiência fotoquímica do PS II (SANTOS, 2004; JIANG *et al.*, 2006; STEPIEN, KLOBUS, 2006) quando expostas a salinidade, embora ocorram algumas exceções (ZANANDREA *et al.*, 2006; SANCHEZ; SYVERFSEN, 2006).

Na figura 4D, são mostrados os teores relativos de clorofila (em unidades arbitrárias ou leituras SPAD) para as três espécies estudadas. Similarmente ao apresentado para a relação F_v/F_m , os teores relativos de clorofila nas plantas de algodão e sorgo não mostraram alteração significativa entre os tratamentos salinos a 4,0 e 8,0 $dS\ m^{-1}$ e os respectivos controles, porém, apresentaram um acréscimo de 20% na dose mais elevada de sal, em relação ao controle, para o caso das plantas de feijão-de-corda. Praxedes (2008), estudando cultivares de feijão-de-corda com tolerância diferencial à salinidade, observou que, no cultivar tolerante, os teores de clorofila estimados com um medidor portátil (leitura SPAD) foram aumentados pela salinidade e que esses aumentos estavam correlacionados com o espessamento das folhas das plantas de feijão-de-corda. Dessa maneira, pode-se sugerir que o pequeno acréscimo nos teores de clorofila para as plantas de feijão-de-corda, observados nesse estudo, podem ter sido ocasionados pelo espessamento do mesófilo foliar dessas plantas, não sendo, portanto, um efeito direto da salinidade.

5.6. Peroxidação de lipídios de membrana e atividade das enzimas do estresse oxidativo

O resumo da ANOVA apresentado na Tabela 8 mostra que as concentrações de malondialdeído (MDA) nas folhas e as atividades das enzimas SOD, CAT, APX e GPX em folhas e raízes foram afetadas significativamente pela fonte de variação relativa às espécies, bem como em relação aos tratamentos salinos, exceto para a GPX nas folhas e a APX nas raízes. Contudo, para todos os parâmetros estudados a interação espécie x tratamento foi significativa. Esse efeito significativo na interação entre as fontes de variação para tais variáveis indicam que as mesmas foram afetadas diferentemente pelos tratamentos, sendo esse efeito significativamente dependente da espécie.

De maneira geral, o feijão-de-corda foi a espécie que apresentou os maiores níveis de peroxidação lipídica, tanto em condições de baixa salinidade (controle) como de média e elevada salinidade (Figura 5). O incremento da concentração de NaCl na solução nutritiva reduziu o conteúdo de MDA nas folhas das plantas de algodão em 52,3% (no tratamento de média salinidade) e 24,5% (alta salinidade), em relação ao tratamento controle. Por outro lado, no feijão-de-corda, ocorreu um aumento no conteúdo de MDA de cerca de 39,6%, para os tratamentos salinos a 4,0 e 8,0 dS m⁻¹, em relação ao tratamento controle (0,9 dS m⁻¹). Já no sorgo, as concentrações de NaCl na solução nutritiva não foram capazes de alterar o conteúdo de MDA nas folhas dessas plantas (Figura 5).

O MDA é um produto da decomposição dos ácidos graxos poliinsaturados e seus aumentos em plantas têm sido largamente utilizados como um bom indicador de peroxidação lipídica em condições de estresse salino, servindo muitas vezes para discriminar entre espécies tolerantes e sensíveis à salinidade (MELONI *et al.*, 2003; STEPIEN; KLOBUS, 2005). Na presente investigação, os níveis de peroxidação lipídica foram significativamente

Tabela 8 - Análise de variância (valores *F*) para os dados de MDA em folhas e para a atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do guaiacol (GPX), dismutase do superóxido (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX) em folhas e raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland ½ de 0,9 dS m⁻¹ de CE (baixo nível de sal) e solução nutritiva de Hoagland ½ adicionada de sal, com CE de 4,0 (médio nível de sal) e 8,0 dS m⁻¹ (alto nível de sal). . Diferenças significativas são representadas por (***), (**) e (*) para *p* ≤ 0,001, *p* ≤ 0,01, *p* ≤ 0,05, respectivamente. (ns) = não significativo.

Fontes de variação	Folhas					Raízes			
	MDA	SOD	CAT	APX	GPX	SOD	CAT	APX	GPX
Espécie (E)	149,83***	170,51***	144,14***	5468,99***	412,74***	387,26***	171,81***	628,47***	277,35***
Tratamento (T)	9,13***	19,19***	10,54***	5,20**	0,547 ^{ns}	5,47**	15,24***	1,52 ^{ns}	27,29***
Interação (T x E)	23,72***	28,23***	6,49***	2,79*	22,02***	4,83**	3,57*	5,50***	45,26***

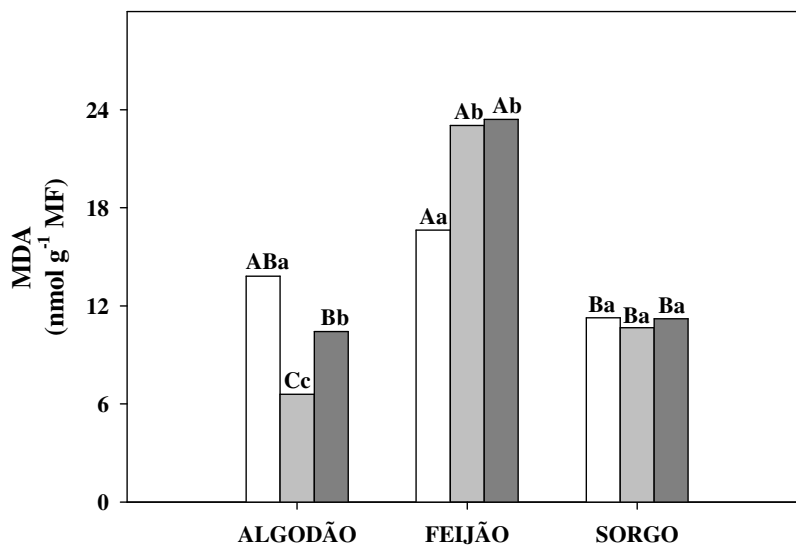


Figura 5. Conteúdo de malondialdeído (MDA) em folhas de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de $0,9 \text{ dS m}^{-1}$ de CE (baixa salinidade - \square) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de $4,0$ (média salinidade - \square) e $8,0 \text{ dS m}^{-1}$ (alta salinidade - \blacksquare). Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento e com mesmas letras minúsculas em uma mesma espécie não são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.

aumentados nos tratamentos de média e alta salinidade na espécie mais susceptível à salinidade (o feijão-de-corda), enquanto na mais tolerante (o algodão) para os mesmos tratamentos, foram observadas reduções (Figura 5). Esses resultados sugerem que a salinidade não induz peroxidação de lipídios em plantas de algodão, ou, ainda, que as plantas de algodão apresentam alta proteção oxidativa sob condições de salinidade.

Na Figura 6 pode ser observado o efeito da salinidade na atividade da SOD em folhas e raízes de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo. Os tratamentos salinos não ocasionaram alteração na atividade dessa enzima nas folhas das plantas de sorgo e feijão-de-corda, porém, para o algodão, foi observada uma redução de 36,4% na atividade desta enzima no tratamento com alto nível de salinidade, quando comparado ao tratamento com baixo nível de salinidade (Figura 6A).

As alterações na atividade da SOD não se correlacionaram com as variações nos níveis de peroxidação dos lipídios entre as espécies estudadas (Figura 5). Enquanto no feijão-de-corda o estresse salino a 4,0 e 8,0 dS m⁻¹ causou aumento na peroxidação dos lipídios, a atividade da SOD não sofreu qualquer alteração; no algodão, apesar de haver uma redução na peroxidação dos lipídios pelo estresse salino, a atividade da SOD ao invés de aumentar diminuiu no mais alto nível de salinidade; no sorgo, por outro lado, o estresse salino não causou alterações na peroxidação lipídica e nem alteração na atividade da SOD. Embora diversos trabalhos apontem a importância da SOD na proteção oxidativa dos lipídios (SHALATA *et al.*, 2001; MELONI *et al.*, 2003, FERREIRA-SILVA, 2008), os resultados aqui apresentados demonstram que isto depende da espécie estudada. É importante ressaltar, que a atividade da SOD e de outras enzimas antioxidativas variam muito ao longo do desenvolvimento das plantas (PARIDA; DAS; MOHANTY, 2004; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005; JOGESWAR *et al.*, 2006) o que pode ser motivo de resultados negativos com relação

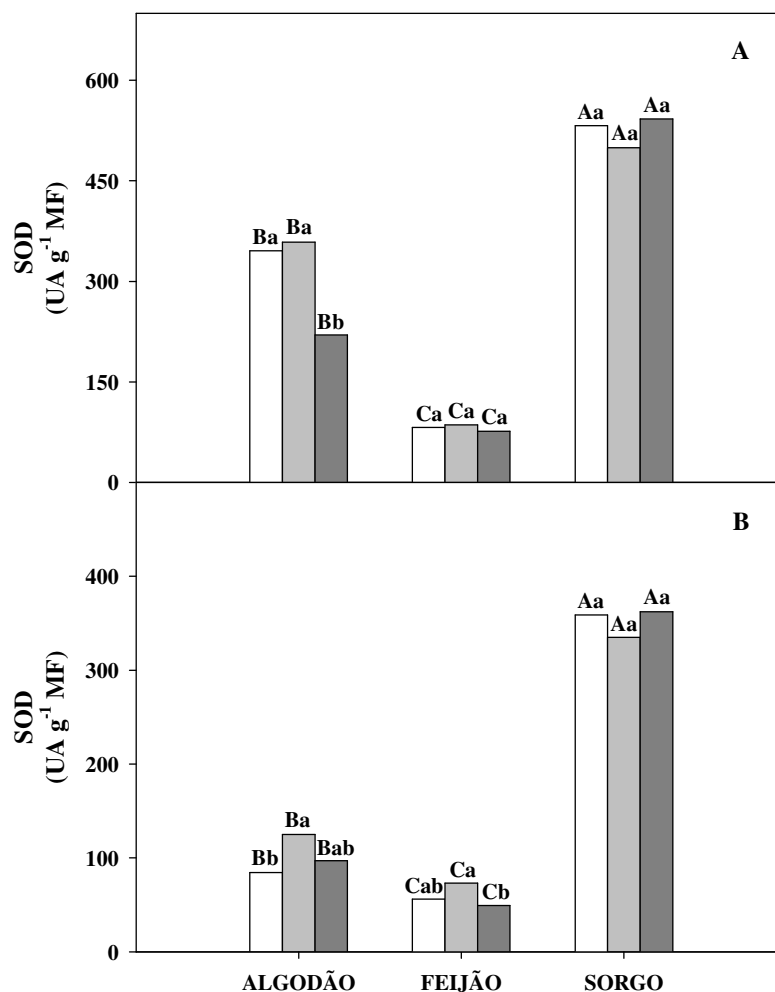


Figura 6. Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva de Hoagland ½ de 0,9 dS m⁻¹ de CE (baixa salinidade - □) e solução nutritiva de Hoagland ½ adicionada de sal, com CE de 4,0 (média salinidade - ■) e 8,0 dS m⁻¹ (alta salinidade - ■). Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento e com mesmas letras minúsculas em uma mesma espécie não são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

à SOD na proteção oxidativa (CAVALCANTI *et al.*; 2004, 2007). Os resultados aqui obtidos com relação à atividade da SOD e a peroxidação dos lipídios permitem sugerir que a proteção oxidativa depende do sistema antioxidativo como um todo e não apenas da atividade de uma determinada enzima ou antioxidante não enzimático (MITTOVA *et al.*, 2002; MELONI *et al.*, 2003; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005).

Nas raízes, as plantas de algodão apresentaram um aumento na atividade da SOD, no tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹, enquanto no tratamento a 8,0 dS m⁻¹ não houve diferença estatística em relação aos tratamentos a 0,9 e 4,0 dS m⁻¹ (Figura 6B). No feijão-de-corda, a atividade da SOD no tratamento a 4,0 dS m⁻¹ foi 30,3% superior àquela do tratamento a 8,0 dS m⁻¹, porém, os valores de atividade nesses dois tratamentos salinos não diferiram daqueles do controle. Já nas raízes das plantas de sorgo, não foi observada qualquer diferença entre os tratamentos salinos (baixa, média e alta salinidade). Da mesma forma que o observado nas folhas, a atividade da SOD nas raízes das plantas de sorgo, em qualquer tratamento, foi superior àquela do algodão, que por sua vez apresentou atividade da SOD maior que aquela do feijão-de-corda. Shalata *et al.* (2001), estudando a atividade enzimática antioxidativa nas raízes de dois cultivares de arroz, com graus diferenciados de tolerância à salinidade, observaram que quando esses foram submetidos a 100 mM de NaCl, a atividade da SOD decresceu nas raízes do cultivar sensível, mas aumentou nas raízes do cultivar tolerante. Em contraste, estudos realizados por Demiral e Turkan (2005), comparando dois cultivares de arroz com diferenças no grau de tolerância ao estresse salino, verificaram que a atividade da SOD nas raízes, não foi alterada pelos tratamentos salinos de 60 e 120 mol m⁻³ de NaCl adicionados a solução nutritiva, em ambos os cultivares.

Azevedo Neto *et al.* (2006), comparando as respostas da SOD em folhas e raízes de plantas de milho, submetidas a condições salinas, observaram que elas foram diferentes, ou

seja, folhas e raízes responderam de forma independente ao excesso de sais, sendo que a atividade da SOD nas raízes foi pouco afetada pelo estresse salino.

A atividade da catalase (CAT) nas folhas e raízes das plantas de algodão e feijão-de-corda não foi influenciada significativamente pelos tratamentos salinos contrariamente ao ocorrido no sorgo (Figura 7). Nas folhas dessa espécie, os tratamentos a média e alta salinidade inibiram igualmente a atividade dessa enzima, ocasionando um decréscimo de cerca de 37%, na atividade da CAT quando comparada com o controle (Figura 7A). Por outro lado, nas raízes das plantas de sorgo, a atividade dessa enzima no tratamento a 8,0 dS m⁻¹ foi superior àquele do tratamento a 4,0 dS m⁻¹, porém não houve diferença significativa entre esses dois tratamentos salinos em relação ao tratamento a 0,9 dS m⁻¹ (Figura 7B).

Quando as atividades da SOD e da CAT, em folhas e raízes são comparadas entre as espécies estudadas, sob condições controle, pode ser observado que, de maneira geral, o algodão e o sorgo apresentaram maiores valores de atividades dessas duas enzimas que o feijão-de-corda (Figura 6 e 7). Tais diferenças sugerem que o sistema enzimático antioxidativo constitutivo seja mais eficiente no algodão e no sorgo do que no feijão-de-corda, o que pode, pelo menos em parte, ser responsável pela maior susceptibilidade do feijão-de-corda ao estresse salino, tendo em vista que a atividade da SOD, associada à da CAT, é considerada por muitos autores como a primeira linha de defesa das plantas contra o estresse oxidativo (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; MITLLER, 2002). Essa idéia é apoiada por outros estudos que também sugerem maior tolerância à salinidade em espécies que possuem um sistema enzimático antioxidativo constitutivo mais eficiente (BANDEOGLU *et al.*, 2004; STEPIEN; KLOBUS, 2005; DEMIRAL; TURKAN, 2005). Além disso, os maiores valores de MDA (Figura 5), em qualquer tratamento foram observados nas folhas do feijoeiro, indicando ser, dentre as espécies estudadas, a que apresenta maior peroxidação lipídica, fato

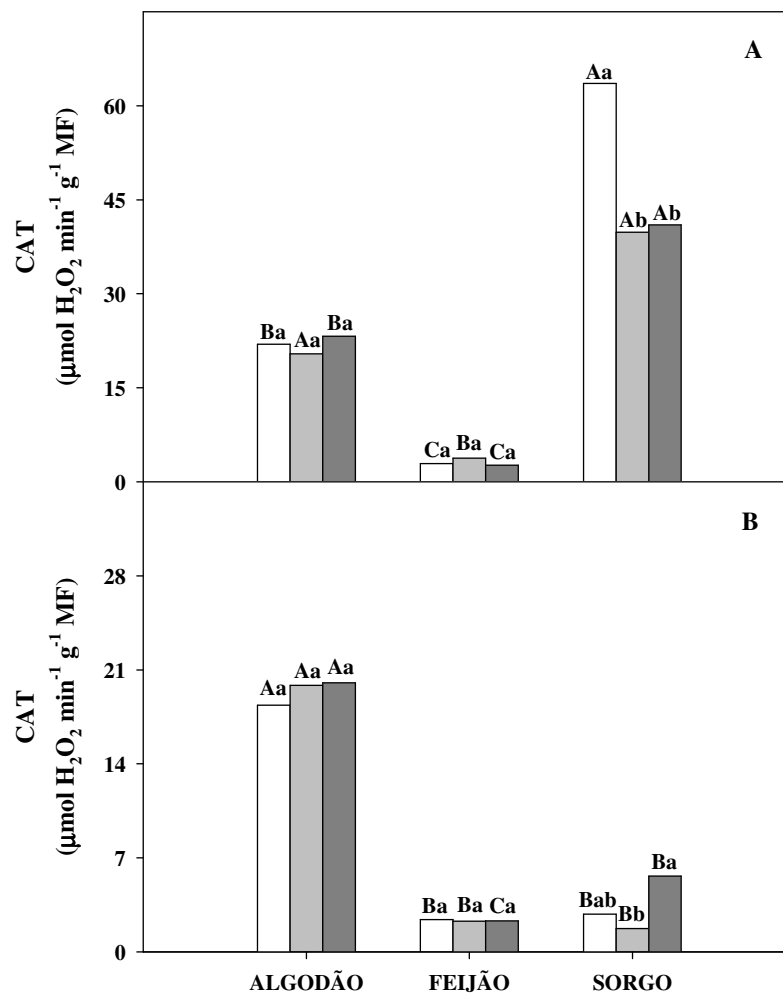


Figura 7. Atividade da catalase (CAT) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva de Hoagland ½ de 0,9 dS m⁻¹ de CE (baixa salinidade - □) e solução nutritiva de Hoagland ½ adicionada de sal, com CE de 4,0 (média salinidade - ◻) e 8,0 dS m⁻¹ (alta salinidade - ◼). Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento e com mesmas letras minúsculas em uma mesma espécie não são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

que corrobora com a sugestão de ser a espécie com sistema antioxidativo constitutivo menos eficiente.

A peroxidase do ascorbato (APX) é uma importante enzima do sistema antioxidativo, que atua reduzindo o H_2O_2 a água, usando o ascorbato como agente redutor (ASADA, 1992). No presente estudo, a salinidade não afetou a atividade da APX nas folhas de feijão-de-corda e sorgo, enquanto no algodão, somente o tratamento salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ variou em relação ao controle, tendo apresentado um valor 27% superior a este último (Figura 8A). Nas raízes, o NaCl adicionado a solução nutritiva (tratamentos a $4,0$ e $8,0 \text{ dS m}^{-1}$) não ocasionou mudanças significativas na atividade da APX nas plantas de feijão-de-corda, comparadas com as plantas cultivadas em solução nutritiva sem adição de NaCl ($0,9 \text{ dS m}^{-1}$) (Figura 8B). No entanto, para o algodão, foi observado um decréscimo de 20,4% na atividade dessa enzima no tratamento salino a $8,0 \text{ dS m}^{-1}$ quando comparado com o tratamento a $0,9 \text{ dS m}^{-1}$, enquanto para o sorgo a atividade da APX foi aumentada de 42,6%, no mais alto nível de salinidade, comparado com o de mais baixo nível de salinidade (Figura 8B). Os dados aqui apresentados mostram que a atividade constitutiva da APX nas raízes das plantas de sorgo foi maior que a encontrada nas folhas, enquanto nas plantas de feijão-de-corda a atividade constitutiva foi maior nas folhas do que nas raízes (Figura 8). Bandeoglu *et al.* (2004), estudando *Lens culinares* sob condições salina, observaram que a atividade da APX foi significativamente aumentada nas folhas, enquanto não foram observadas alterações nas raízes e que a proteção oxidativa das raízes, deveu-se a alta atividade constitutiva dessa enzima aliada aos aumentos na SOD. Concordando com esses resultados Demiral e Turkan (2005), comparando dois cultivares de arroz (Pokkali e IR-28) diferindo na tolerância à salinidade, encontraram uma correlação positiva entre a atividade da APOX ou APX nas raízes e a tolerância à salinidade em arroz.

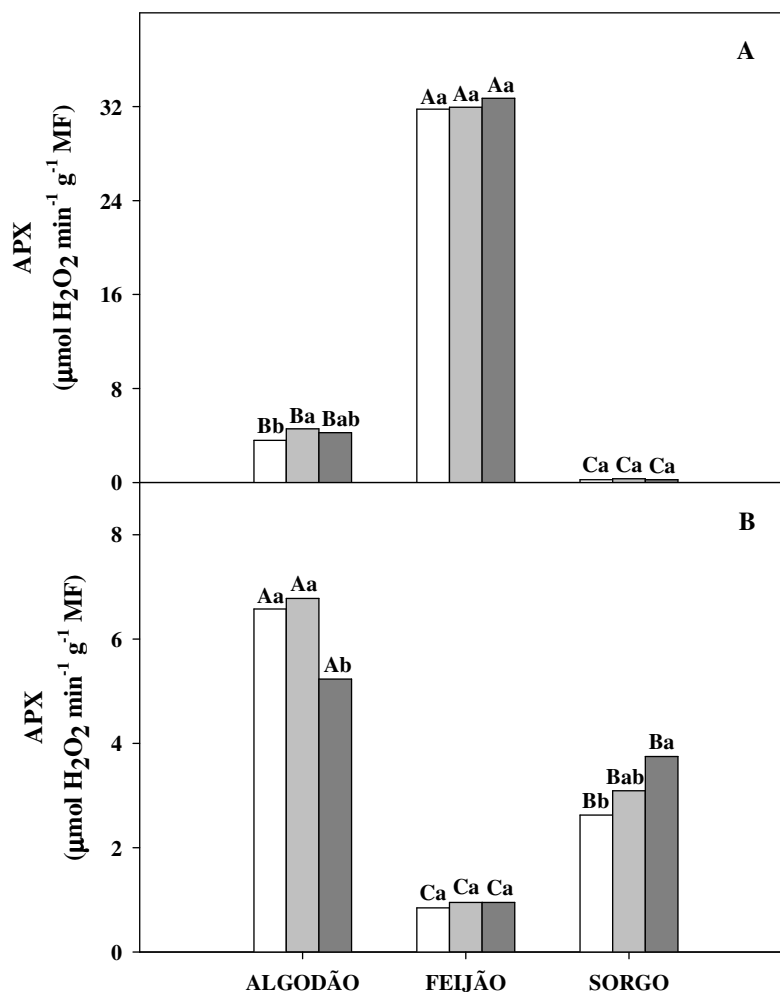


Figura 8. Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ de 0,9 dS m^{-1} de CE (baixa salinidade - □) e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ adicionada de sal, com CE de 4,0 (média salinidade - ◻) e 8,0 dS m^{-1} (alta salinidade - ◼). Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento e com mesmas letras minúsculas em uma mesma espécie não são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Em relação à peroxidase do guaiacol (GPX), pode ser observado que, tanto em folhas como em raízes, essa enzima apresentou-se de maneira bem diferenciada entre as três espécies estudadas (Figura 9). Nas folhas, a atividade da GPX no algodão decresceu, em média 27%, nos tratamentos salinos a 4,0 e 8,0 dS m⁻¹; no feijão-de-corda, a atividade dessa enzima não foi afetada pelo estresse salino e no sorgo, observou-se um aumento cerca de 67,6% na atividade da GPX nos tratamentos de média e alta salinidade, em relação ao controle (Figura 9A). Nas raízes, a atividade da GPX no algodão, no tratamento de elevada salinidade, sofreu um decréscimo de 47,5%, em relação ao controle; no feijão-de-corda, os tratamentos de média e elevada salinidade promoveram um aumento de 22,7% na atividade da GPX; enquanto no sorgo, os tratamentos a 4,0 e 8,0 dS m⁻¹ provocaram aumentos na atividade dessa enzima, porém o aumento foi maior no mais elevado nível de salinidade (Figura 9B).

Estudos realizados por Vaidyanathan *et al.* (2003), comparando dois cultivares de arroz com diferenças no grau de tolerância ao estresse salino verificaram que a atividade da GPX aumentou em ambos os cultivares. Em contraste, Costa *et al.* (2005), estudando dois genótipos de sorgo com tolerância diferencial ao estresse salino observaram que a atividade da GPX nas folhas do genótipo tolerante (CSF 20) aumentou em relação ao seu respectivo controle, enquanto no genótipo sensível (CSF 18) a atividade dessa enzima foi reduzida. Nesse mesmo estudo, nas raízes, a atividade da GPX no genótipo CSF 20 não foi alterada pelo tratamento salino, enquanto que no genótipo CSF 18 ocorreu um decréscimo. Em nosso estudo, os dados encontrados para a atividade da GPX nas folhas das plantas de sorgo e feijão-de-corda foram similares aos encontrados por esses autores para o genótipo tolerante (Figura 9). Dessa maneira, podemos sugerir que a atividade da GPX é modulada diferentemente pelo estresse salino, dependendo, portanto, da concentração de sal e da espécie estudada.

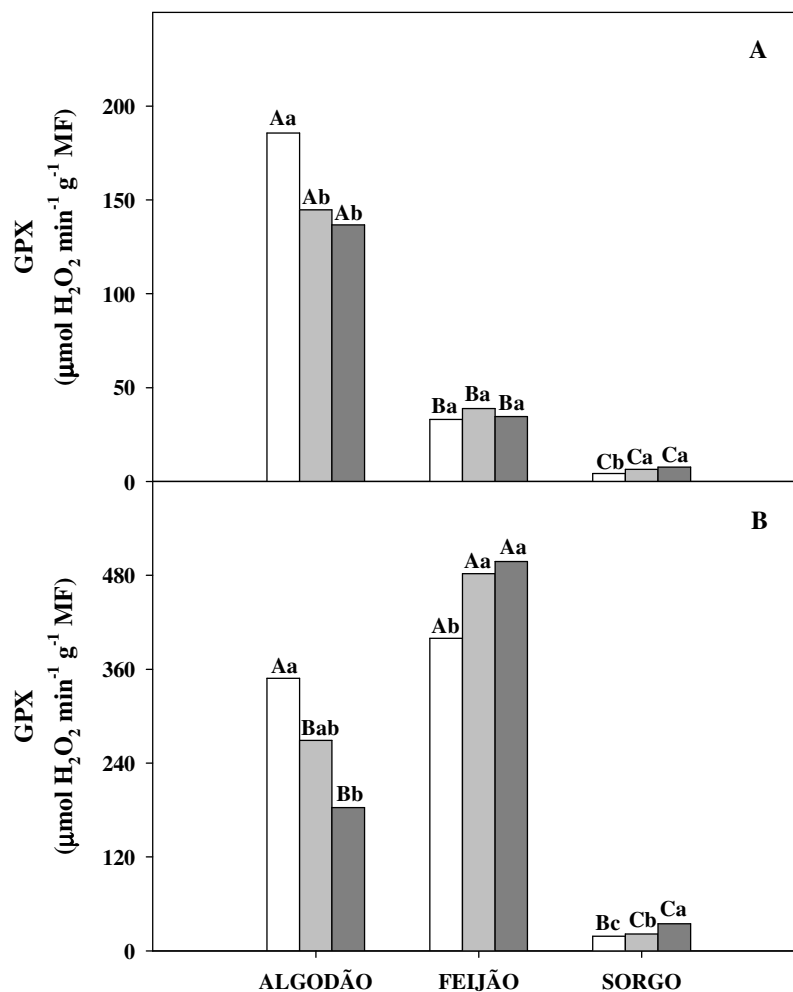


Figura 9. Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de algodão, feijão-de-corda e sorgo cultivadas em solução nutritiva de Hoagland ½ de 0,9 dS m⁻¹ de CE (baixa salinidade - □) e solução nutritiva de Hoagland ½ adicionada de sal, com CE de 4,0 (média salinidade - ◻) e 8,0 dS m⁻¹ (alta salinidade - ◼). Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento e com mesmas letras minúsculas em uma mesma espécie não são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Alguns autores têm ressaltado a importância da coordenação entre a atividade da SOD com as atividades da CAT, APX e GPX nos processos de remoção do O_2^- e do H_2O_2 e, conseqüentemente, na tolerância a salinidade (MITTOVA *et al.*, 2002; MELONI *et al.*, 2003; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005).

Vaidyanathan *et al.* (2003), trabalhando com dois cultivares de arroz diferindo na resistência à salinidade, observaram que o cultivar resistente (Pokkali) apresentou maior atividade das enzimas oxidativas SOD, CAT e GR associada a menor peroxidação lipídica, comparado ao sensível (IR-28). Em outros cultivares de arroz diferindo na tolerância a salinidade (Lunishree, tolerante e Begunbitchi, sensível), o aumento significativo da indução do sistema enzimático SOD, CAT, POX e GR observado nas raízes do cultivar tolerante expostos a estresse salino (50, 100 e 150 mM de NaCl) por 24 horas, foi correlacionado com sua maior proteção oxidativa (KHAN; PANDA, 2008). Meloni *et al.* (2003), demonstrou que a tolerância ao estresse salino em cultivares de algodão (*Gossypium hirsutum*) contrastante na tolerância à salinidade, está associada a melhor performance fotossintética e a maior eficiência do sistema enzimático antioxidativo SOD, GR e POD do cultivar tolerante.

A proteção contra os danos oxidativos induzidos pelo estresse salino em diferentes espécies de plantas também pode estar relacionada com a indução dos sistemas de proteção enzimáticos e não-enzimáticos. Em tomate (*Lycopersicon esculentum*), foi demonstrado que a diferença em tolerância ao estresse salino entre um cultivar (M82) e sua respectiva espécie selvagem, considerada tolerante à salinidade, está associada a uma maior eficiência do sistema antioxidativo SOD, APX, CAT e MDHAR e do status redox do ASC e GSH em resposta ao estresse salino (SHALATA *et al.*, 2001). Ferreira-Silva (2008), em estudo realizado com plântulas de cajueiro anão-precoce submetidas a diferentes concentrações de NaCl adicionado a solução nutritiva, demonstrou que essas plântulas possuem alta capacidade

de aclimação à salinidade e que isso, pode ser atribuído à restrição estomática, associada a uma eficiente combinação de mecanismos antioxidativos enzimáticos (SOD e CAT) e não-enzimáticos (ASC e GSH), que evitam o acúmulo excessivo de H_2O_2 e impedem a peroxidação lipídica.

6. CONCLUSÕES

1. Os dados de crescimento confirmam a maior tolerância do algodão e a maior sensibilidade do feijão-de-corda ao estresse salino;
2. O gradiente de potencial hídrico entre folhas e raízes foi mantido sob condições de salinidade o que se refletiu num adequado *status* hídrico foliar nas plantas das três espécies;
3. Os solutos inorgânicos contribuíram mais que os solutos orgânicos para o abaixamento do potencial osmótico sob condições de média e alta salinidade nas três espécies estudadas;
4. Embora a salinidade tenha provocado aumentos nas concentrações de prolina para as três espécies estudadas, os resultados sugerem um papel secundário desse osmólito no ajustamento osmótico das plantas;
5. A salinidade não ocasionou danos ao aparato fotossintético das plantas estudadas, sendo possível que essa eficiência fotoquímica, pelo menos em parte, seja devido à proteção do aparato fotossintético contra o estresse oxidativo;
6. O feijão-de-corda foi à espécie que mostrou a maior taxa de peroxidação lipídica foliar, quando submetida ao estresse salino;
7. O sistema antioxidativo enzimático constitutivo/induzido das plantas de algodão e sorgo nas folhas e raízes, parece ser mais eficiente do que o do feijão-de-corda. Isso pelo menos em parte, pode ser o fator responsável pela maior tolerância do algodão e a maior sensibilidade do feijão-de-corda à salinidade;
8. A maior tolerância do algodoeiro à salinidade não está necessariamente associada com a exclusão de íons tóxicos (Na^+ e Cl^-) dos tecidos fotossintetizantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, J.; ANWAR-UL-HAQ, M.; AHMAD, K.; SAQIB, M.; SAEED, M.A. Performance of cotton genotypes under saline conditions. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 17, p. 29-36, 2005.

ALGODÃO BRASILEIRO. **Cultura do Algodão**. 2009. Disponível em: <<http://www.algodao.agr.br/>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

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

ANDRADE JÚNIOR, A.S. de; SANTOS, A.A. dos; SOBRINHOS, C.A. **Cultivo de feijão caupi**. (Embrapa Meio-Norte. Sistemas de Produção, 2, JAN 2003). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/importancia.htm>>. Acesso em: 15 dezembro 2009.

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

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

ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current science**, v. 82, p. 1227-1238, 2002.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 50, p. 187-204, 1999.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 235-241, 1992.

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

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

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 84-93, 2009.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D.W. **A qualidade da água na agricultura**. Tradução de H.R. GHEYI, J.F. de MEDEIROS; F.A.V. DAMASCENO. Campina Grande: UFPB, 1991.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D.W. **A qualidade de água na agricultura**. 2.ed. Campina Grande: UFPB, 1999, 153p. FAO. (Estudos Irrigação e Drenagem, 29 revisado).

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

AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; MEDEIROS, J.R.; GOMES-FILHO, E. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 1114-1122, 2005.

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

BAKER, N.R.; ROSENQVST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Plant Physiology**, v. 55, p. 1607-1621, 2004.

BANDEOGLU, E.; EYIDOGAN, F.; YÜCEL, M.; OKTEM, H.A. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. **Plant Growth Regulation**, v. 42, p. 69-77, 2004.

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.

BEAUCHAMP, C.; FRICOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 246-254, 1976.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**, Rockville: ASPP, 2000. p. 1158-1203.

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

CAMARGO, P.M.P.; COSTA, R.C.; BARRETO, A.G.T.; NETO, C.F.O.; CRUZ, F.J.R. Mecanismos de tolerância ao estresse salino relacionados com o metabolismo de nitrogênio e ajustamentadores osmótico em plantas de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. In: Seminário de Iniciação Científica, 4./Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA, 12., 2008, Manaus. **Anais...**Manaus: Embrapa Amazonia Oriental, 2008. p.

CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.

CAVALCANTI, F.R.; OLIVEIRA, J.T.A.; MARTINS-MIRANDA, A.S.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v. 163, p. 563-571, 2004.

CAVALCANTI, F.R.; OLIVEIRA, J.T.A.; LIMA, J.P.M.S.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 591-600, 2007.

- CORDEIRO, G.G. **Salinidade em agricultura irrigada**: conceitos básicos e práticos. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido, 2001. 38 p. (EMBRAPA, Documentos, n.º 180.).
- COSTA, P.H.A.; SILVA, J.F.; BEZERRA, M.A.; ENÉAS FILHO, J. PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 289-297, 2003.
- COSTA, P.H.A.; AZEVEDO NETO, A.D.; BEZERRA, M.A.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 353-361, 2005.
- CRUZ, J.L.; CLAUDINÉIA, R.P.; PELACANI, R.; COELHO, E.F.; CALDAS, R.C.; ALMEIDA, A.Q.; QUEIROZ, J.R. Influência da salinidade sobre o crescimento, absorção e distribuição de sódio, cloro e macronutrientes em plântulas de maracujazeiro-amarelo. **Bragantia**, v.65, p. 275-284, 2006.
- DAKER, A. **A água na agricultura: manual de hidráulica agrícola**. 5a ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1976.
- DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M. INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 779-795, 2000.
- DEL RIO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GOMES, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p.1255-1272, 2002.
- DEMIRAL, T.; TÜRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 247-257, 2005.
- DESENBAHIA. **Boletim anual do mercado de grãos: algodão safra 2008/09 e expectativas 2009/10**. 2009. Disponível em: < www.desenbahia.ba.gov.br/.../7B1877EBB1-E43F-4D93-96DB-6848361941EE%7D_Rel%20Algodão%202009.pdf > Acesso em: 15 dez. 2009.

DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plant under stressful conditions. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop physiology**. New York: Marcel Dekker, p. 605-625, 1994.

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.

FAGERIA, N.K.; GHEYI, H.R. **Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares**. In: GHEYI, H. R., QUEIROZ, J. E., MEDEIROS, J. F. (Eds). Simpósio " Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada".Campina Grande: UFPB, p. 383, 1997.

FAO. **Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils**. 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

FAO. **Extent and causes of salt-affected soils in participating countries**. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm#top>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

FERREIRA-SILVA, S.L. **Mecanismos de proteção oxidativa contra estresses isolados e combinados de seca, salinidade e temperatura elevada em cajueiro**. 2008. 162 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FLOWERS, T.J.; COLMER, T.D. Salinity tolerance in halophytes. **New Phytologist**, v. 179, p. 945-963, 2008.

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

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

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environmental**, v. 28, p. 1056-1071, 2005.

GADALLAH, M.A.A. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 249-257, 1999.

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.

GAO, Q.; ZHANG, L. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient vtc 1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 138-148, 2008.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GRANT, J.J.; LOAKE, G.J. Role of active oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, v.124, p. 124-21, 2000.

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

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

HAVIR, E.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalases in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.

HONG, C.Y.; KAO, C.H. NaCl-induced expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is not associated with osmotic component. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, p. 199-201, 2008.

HORVÀTH, E.; SZALAI, G.; PÁL, M.; PÁLDI, E.; JANDA, T. Differences between the catalase isozymes of maize (*Zea mays* L.) in respect of inhibition by various phenolic compounds. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, p. 33-34, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola mundial: cereais, leguminosas e oleaginosas**. 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: estatística da produção agrícola**. 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

JÁCOME, A.G.; OLIVEIRA, R.H.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.J.; SOUZA, A.P.; GONÇALVES, A.C.A. Crescimento de genótipos de algodoeiro em função da salinidade da água de irrigação. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 25, p. 305-313, 2003.

JALLEL, C.A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANAVANNAN, P.; INÈS, J.; AL-JUBURI, H.J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiol Plantarum** v. 31, p. 427-436, 2009.

JIANG, Q.; ROCHE, D.; MONACO, T.A.; DURHAM, S. Gas exchange, chlorophyll fluorescence parameters carbon isotope discrimination of 14 barley genetic lines in response to salinity. **Field Crops Research**, v. 96, p. 269-278, 2006.

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J.A.; DEL RÉO, L.A.; SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, v. 114, p. 272-284, 1997.

JOGESWAR, G.; PALLELA, R.; JAKKA, N.M.; REDDY, P.S.; VENKATESWARA RAO, J.; SREENIVASULU, N.; KAVI KISHOR, P.B. Antioxidative response in different sorghum species under short-term salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 28, p. 465-475, 2006.

KHAN, M.H.; PANDA, S.K. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 81-89, 2008.

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

KRAUSE, F.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.

LACERDA, C.F. **Crescimento e acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos em dois genótipos de sorgo forrageiro submetidos a estresse salino**. 2000. 163 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LACERDA, C.F.; OLIVEIRA, H.P.M.; OLIVEIRA, T.S.; GOMES-FILHO, E. Crescimento e acúmulo de íons em folhas de sorgo forrageiro submetido a soluções iso-osmóticas de sais (NaCl + KCl). **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, p. 1-6, 2003a.

LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A.; RUIZ, H.A.; PRISCO, J.T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 113-118, 2003b.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: ed. Rima Artes e Textos, 2000. 531p.

LIRA, M.A.; FARIS, M.A.; MAFRA, R.C. Soil fertility and fertilizer use research in intercropping systems in Northeast Brazil. **Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin**, v. 5, p. 151-156, 1982.

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

MARTÍNEZ-BALLESTA, M.C.; MARTÍNEZ, V.; CARVAJAL, M. Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. **Environmental and Experimental Botany**, v. 41, p. 237-254, 2004.

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

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.

MELONI, D.A.; GULOTTA, M.R.; MARTÍNEZ, C.A.; OLIVA, M.A. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 39-46, 2004.

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

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

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

MØLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561-591, 2001.

MONTE, W.B.; HERNANDEZ, F.F.F.; LACERDA, C.F.; NESS, R.L.L. Crescimento e teores de minerais em plantas jovens de bananeira submetidas a estresse salino. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, p. 157-164, 2004.

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

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

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

MUNNS, R.; HUSAIN, S.; RIVELLI, A.R.; JAMES, R.A.; CONDON, A.G.T.; LINDSAY, M.P.; LAGUDAH, E.S.; SCHACHTMAN, D.P.; HARE, R.A. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. **Plant and Soil**, v. 247, p. 93-105, 2002.

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

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NETONDO, G.W.; ONYANGO, J.C.; BECK, E. Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. **Crop Science**, v. 44, p. 806-811, 2004.

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

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

OLIVEIRA, L.A.A.; BARRETO, L.P.; NETO, E.B.; SANTOS, M.V.F.; COSTA, J.C.A. Solutos orgânicos em genótipos de sorgo forrageiro sob estresse salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 31-35, 2006.

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.; MOHANTY, P. Defense potentials to NaCl in mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 531-542, 2004.

PIZARRO, J.C.A. **Caracteres fisiológicos e bioquímicos da tolerância à salinidade em clones de cajueiro anão-precoce**, 2006. 163 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PRAXEDES, S.C. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em dois cultivares de feijão-de-corda com tolerância diferencial à salinidade**. 2008. 145 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RIBAS, P.M. **Cultivo do sorgo** (Embrapa milho e sorgo. Sistemas de Produção, 2, SET 2008). Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo/importancia.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

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

SANCHEZ, F.G.; SYVERFSEN, J.P. Salinity tolerance of *Cleopata mandarin* and *Carrizo citrange* rootstock seedlings is affected by CO₂ enrichment during growth. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, p. 24-31, 2006.

SANTOS, C.V. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 103, p. 93-99, 2004.

SCANDALIOS, J.G. The rise of ROS. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, p. 483-486, 2002.

SHALATA, A.; MITTOVA, V.; VOLOKITA, M.; GUY, M.; TAL, M. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 487-494, 2001.

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

SILVA, S.M.S; MAIA, J.M.; ARAÚJO, Z.B.; FILHO, F.R.F. **Composição química de 45 genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. EMBRAPA (Comunicado técnico 149), 2002.

SILVA, J.V.; LACERDA, C.F. COSTA, P.H.A.; ENÉAS FILHO, J.; GOMES FILHO, E.; PRISCO, J.T. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl₂. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 15, p.99-105, 2003a.

SILVA, J.V.; LACERDA, C.F. AZEVEDO NETO, A.D.; COSTA, P.H.A.; PRISCO, J.T.; ENÉAS FILHO, J.; GOMES FILHO, E. Crescimento e osmorregulação em dois genótipos de sorgo submetidos a estresse salino. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, p.125-131, 2003b.

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

SIMOVA-STOILOVA, L.; DEMIREVSKA, K.; PETROVA, T.; TSENOV, N.; FELLER, U. Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. **Plant Growth Regulation**, v. 58, p. 107-117. 2009.

SMEETS, K.; OPDENAKKER, K.; REMANS, T.; SANDER, S.V.; BELLEGHEM, F.V.; SEMANE, B.; HOREMANS, N.; GUISEZ, Y. VANGRONVELD, J.; CUYPERS, A. Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1982-1992, 2009.

SMIRNOFF, M.A.A. Metabolism and functions of a multi faceted molecule. **Current Opinion Plant Biology**, v. 3, p. 229-235, 2000.

SOUSA, C.H.C. **Análise da tolerância à salinidade em plantas de sorgo, feijão-de-corda e algodão**. 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SREENIVASULU, N.; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PRAKASH, H.S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITRI, H.S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with different salt tolerance. **Plant Science**, v. 141, p. 1-9, 1999.

STEPIEN, P.; KLOBUS, G. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. **Physiologia Plantarum**, v. 125, p. 31-40, 2005.

STEPIEN, P.; KLOBUS, G. Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativas* L. leaves under salt stress. **Biologia Plantarum**, v. 50, p. 610-616, 2006.

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

TARDIN, F.D.; RODRIGUES, J.A.S. **Cultivo do sorgo**. Embrapa milho e sorgo. Sistemas de Produção, 2, SET 2008. Disponível em: <<http://www.cnpmis.embrapa.br/publicacoes/sorgo/cultivares.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

TULLY, R.L.; HANSON, A.D.; NELSEN, C.E. Proline accumulation in water-stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget. **Plant Physiology**, v. 63, p. 518-523, 1979.

USDA-ARS. Research Databases. Bibliography on Salt Tolerance. George E. Brown, Jr. Salinity Lab. US Dep. Agric., Agric. Res. Serv. Riverside, CA. 2008. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908.2008>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

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

VAN HEERDEN, P.D.R.; KRÜGER, G.H.J.; LOVELAND, J.E.; PARRY, M.A.J.; FOYER, C.H. Dark chilling imposes metabolic restrictions on photosynthesis in soybean. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 323-337, 2003.

VEERANAGAMALLAIAH, G.; CHANDRAOBULREDDY, P.; JYOTHSNAKUMARI, G.; SUDHAKAR, C. Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase activity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italica* L.) with differential salt sensitivity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 239-244, 2007.

WANG, X; QUINN, P.J. The location and function of vitamin E in membranes. **Molecular Membrane Biology**, v. 17, p. 143-156, 2000.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. de L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U.M.T. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 500 p.

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

YASAR, F.; ELLIALTIOGLU, S.; YILDIZ, K. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 55, p. 782-786, 2008.

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

YE, X.; PAN, S.Q.; KUC, J. Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance to tobacco to blue mold (*Peronospora tobaciana*) and to tobacco mosaic virus. **Phytopatology**, v. 80, p. 1295-1299, 1990.

ZANANDREA, I.; NASSI, F.L.; TURCHETTO, A.C.; BRAGA, E.J.B.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A. Efeito da salinidade sob parâmetros de fluorescência em *Phaseolus vulgaris*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, p. 157-161, 2006.

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

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