

Controle Fonte-Dreno da Mobilização de Reservas na Germinação e Estabelecimento de Plântulas de Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) Expostas à Salinidade

LUIZ FERREIRA AGUIAR PONTE

FORTALEZA – CEARÁ

Abril de 2007

Controle Fonte-Dreno da Mobilização de Reservas na Germinação e Estabelecimento de Plântulas de Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) Expostas à Salinidade

LUIZ FERREIRA AGUIAR PONTE

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

FORTALEZA – CEARÁ

Abril de 2007

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

P857c Ponte, Luiz Ferreira Aguiar

Controle fonte-dreno da mobilização de reservas durante a germinação e estabelecimento de plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) expostas à salinidade / Luiz Ferreira Aguiar Ponte.

125f., il. color., enc.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

Área de Concentração : Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

1. Estresse salino 2. Proteinase 3. Fisiologia da germinação
I. Silveira, Joaquim Albenísio Gomes da (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

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

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

Tese aprovada em 27 de Abril de 2007.

Luz Férreia Aguiar Ponte

Biólogo, M.Sc.

Dr. Joaquim ~~Albenisio~~ Gomes da Silveira
UFC/DBBM – Orientador

Dra. Norma Maria Barros Benevides
UFC/DBBM – Conselheiro

Dr. Sebastião Medeiros Filho
UFC/FITOTECNIA – Conselheiro

Dr. Ricardo Almeida Viégas
UFCG – Conselheiro

Dr. Levi de Moura Barros
EMBRAPA/CNPMPN – Conselheiro

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre me fazer sorrir, inclusive durante as tempestades.

Aos **produtores de cajueiro**, que fornece através dos frutos uma fonte de renda para milhares de nordestino e que nos estimula a fazer ciência.

Ao Prof.. **Joaquim Albenísio**, por ser tutor dessa tese e estar presente no momento adequado.

Ao Prof. **Francisco Campos**, por contribuir com os primeiros passos da vida minha acadêmica.

Aos professores **Renato Moreira, Norma Benevides e Marcio Viana**, pelo incentivo, acolhimento. As amigas **Tânia Almeida e Roberta Magalhães**, pelo pioneirismo no trabalho com a mobilização das reservas do cajueiro, servindo como base para minha tese.

Ao doutorando e amigo **Eduardo Voigt**, pela paciência e incansável vontade de repassar conhecimentos, sendo parceiro direto da minha tese.

Aos doutorandos **Christine Russo, Batista Santiago, Iza Marineves, João Paulo Lima, Josemir Moura, Lucilene e Sérgio Luiz** (na ordem alfabética), pelo companheirismo e cumplicidade.

Ao Dr. **Paiva**, pesquisador da EMBRAPA, pela atenção e disponibilidade de tempo quando preciso foi durante o desenvolvimento da tese.

Ao funcionário da EMBRAPA **Justino**, pela amizade, recepção e fornecimento das castanhas durante todo o desenvolvimento da tese.

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

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

Aos funcionários, sempre prestativos.

Aos amigos **Fábio Rossi, Flávia Carinne, Abel, Sandro, Jean, Adilton, Marcelo, Rafael, Tatiane, Evandro e Edinilda (Nega)** pela amizade e convivência maravilhosa.

A **Universidade Estadual Vale do Acaraú** e aos **professores do curso de Biologia** pela flexibilidade dos meus horários durante o período da minha tese.

À minha esposa **Vânia Lemos** e minha irmã **Maria Gorete**, pela compreensão e paciência.

Aos **meus pais**, motivo real de tudo que sou.

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

*Dedico a minha esposa Vânia e
ao nosso filho.*

Fico feliz pela parcela da humanidade consciente, que busca nesse momento soluções para um planeta Terra mais saudável e com mais árvores, e fico mais feliz ainda com a força-tarefa que os governantes e cidadãos estão realizando para salvar nosso lar. Acho que ainda não é tarde, mas devemos sempre nos lembrar que somos apenas mais uma espécie neste planeta.

Que Deus nos abençoe.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- Universidade Federal do Ceará
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical.
- FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
<u>CAPÍTULO 1</u> - Estudo do desenvolvimento de plantas em Resposta ao Estresse Salino: da Germinação a Planta Adulta	1
1.1 Introdução	2
1.2 Processos de Germinação, Estabelecimento de Plântulas e Mobilização de Reservas de Sementes	3
1.3 Salinidade e seus efeitos durante a germinação e estabelecimento de plântulas	5
1.4 Salinidade e seus efeitos nas plantas adultas	10
1.4.1 Efeitos iônicos e toxicidade	11
1.4.2 Principais respostas adaptativas das plantas ao estresse salino	12
1.4.3 Compartimentalização de íons tóxicos	13
1.4.4 Acumulação de íons inorgânicos	14
1.4.5 Absorção de água e crescimento continuado	15
1.5 Respostas de cultivares ao estresse salino	16
1.6 O cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	19
1.7 Efeitos da salinidade no cajueiro	22
1.8 Justificativa	27
1.9 Hipótese Geral	28
1.10 Objetivos	29
1.10.1 Geral	29
1.10.2 Específicos	29
1.11 Referências Bibliográficas	29

<u>CAPÍTULO 2</u> - Partição de fitomassa durante a germinação e estabelecimento das plântulas de cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.) sob salinidade com NaCl	41
2. 1 Introdução	42
2.2 Materias e Métodos	43
2.2.1 Descrição dos experimentos	43
2.2.2 Condições ambientais de semeio	43
2.2.3.Obtenção dos cotilédones e das plântulas	44
2.2.3.1 Semeio I: Efeito da salinidade (NaCl) sobre a mobilização do fluxo de massa durante germinação e o estabelecimento das plântulas coletadas nos mesmos estádios fisiológicos de desenvolvimento	44
2.2.3.2 Semeio II: Efeito da salinidade (NaCl) sobre a mobilização do fluxo de massa durante germinação e o estabelecimento das plântulas coletadas nos mesmos tempo de semeio	45
2.2.4 Determinação da concentração de sódio e potássio	46
2.2.5 Percentagem de germinação das sementes	46
2.2.6 Índice de velocidade de emergência das sementes	46
2.2.7 Teor de Umidade dos cotilédones	47
2.2.8 Delineamento estatístico	47
2.3 Resultados	47
2.3.1 Germinação e estabelecimento de plântulas em sala de crescimento (condições controladas)	47
2.3.2 Germinação e estabelecimento de plântulas em casa de vegetação (condições não controladas)	54
2.4 Discussão	60
2.5 Conclusão	63
2.6 Referências Bibliográficas	63

<u>CAPÍTULO 3</u> - Controle fonte-dreno da mobilização das reservas orgânicas de cotilédones durante o estabelecimento da plântula de cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.) sob salinidade com NaCl	66
3.1 Introdução	67
3.2 Materiais e Métodos	69
3.2.1 Obtenção dos tecidos para análise	69
3.2.2 Extração de Proteínas Solúveis	70
3.2.3 Aminoácidos Livres Totais (AALT)	70
3.2.4 Açúcares solúveis totais	70
3.2.5 Amido	71
3.2.6 Lipídios	71
3.2.7 Determinação de prolina, arginina, ornitina, glutamina e asparagina	71
3.2.8 Fracionamento Protéico	72
3.3 Resultados	74
3.4 Discussão	80
3.5 Conclusão	83
3.6 Referências Bibliográficas	83
<u>CAPÍTULO 4</u> - Introdução ao estudo das proteases e proteínas de reservas em cotilédones de plântulas de cajueiro na presença de NaCl	87
4.1 Introdução	88
4.2 Materiais e Métodos	90
4.2.1 Extração de proteínas solúveis de cotilédones de cajueiro	90
4.2.2 Atividade <i>in vitro</i> das proteases	91
4.2.3 Zimograma PAGE-Nativo unidimensional	91
4.2.4 Eletroforese PAGE-SDS unidimensional	92
4.2.5 Extração e precipitação de proteínas totais de cotilédones de cajueiro	92

4.2.6 Eletroforese PAGE- SDS Bidimensional (2-D)	93
4.3 Resultados	94
4.4. Discussão	102
4.5. Conclusão	105
4.6 Referências Bibliográficas	105

ABREVIATURAS

- 6-BA – 6-benzil-adenina (auxina sintética)
ABA – Ácido abscísico
ATP – Adenosina trifosfato
BSA – Albumina Sérica Bovina
C.R.A. – Conteúdo relativo de água
cv. – Cultivar
DAS - Dias após o semeio
DNA –Ácido desoxirribonucléico
EDTA – Etileno Diamino Tetracético
IVE - Índice de velocidade de emergência
L – Leitura
LEA – Proteínas abundantes da embriogênese tardia
MF – Massa fresca
MS – Massa seca
PEG – Polietilenoglicol
pH – Potencial de hidrogênio
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
TCR – Taxa de crescimento relativo
UA – Unidade de atividade

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2 - Partição de fitomassa durante a germinação e estabelecimento das plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) sob salinidade com NaCl

- Figura 1.** Plântulas coletadas no mesmo tempo de semeadura sob tratamento controle (C) e tratamento salino (50 mM). 49
- Figura 2.** Percentagem de germinação (a) e índice de velocidade de emergência (b) das sementes de cajueiro semeadas na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50 mM 50
- Figura 3.** Curva de embebição (a) das sementes e umidade (b) dos cotilédones de cajueiro semeadas na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50mM 50
- Figura 4.** Massa fresca (a) e massa seca (b) dos cotilédones de cajueiro, cultivadas durante 24 dias após a semeadura, na presença (●) e na ausência (○) NaCl 50mM. 51
- Figura 5.** Conteúdo de sódio (a) e potássio (b) em cotilédones de cajueiro, cultivadas durante 24 dias após a semeadura, na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50mM. 51
- Figura 6.** Massa seca da parte aérea (a) e raiz (b) de plântulas de cajueiro, cultivadas durante 24 dias após a semeadura, na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50 mM 53
- Figura 7.** Partição da biomassa seca nos diferentes órgãos de plântulas de cajueiro, cultivadas durante 24 dias na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50 mM 53
- Figura 8.** Conteúdo de sódio e potássio na parte aérea (a,b) e raiz (c,d) em plântulas de cajueiro, cultivadas durante 24 dias após a semeadura, na presença (●) e na ausência (○) de 50 mM de NaCl 54
- Figura 9.** Plântulas coletadas no mesmo estágio fisiológico sob tratamento controle (C) e tratamento salino (50 mM) 56
- Figura 10.** Massa seca (a) massa fresca (b) e teor de água relativa (c) dos cotilédones de plântulas de cajueiro no mesmo estágio de desenvolvimento fisiológico, na presença (●) e na ausência (○) de 50 mM de NaCl. 57
- Figura 11.** Massa fresca e massa seca da parte aérea (a,b) e raiz (c,d) de plântulas de cajueiro no mesmo estágio de desenvolvimento fisiológico, na presença (●) e na ausência (○) de 50 mM de NaCl 58

Figura 12. Umidade parte aérea (a) e raiz (b) de plântulas de cajueiro no mesmo estágio de desenvolvimento fisiológico, na presença (●) e na ausência (○) de 50 mM de NaCl 59

Figura 13. Comprimento das plântulas de cajueiro no mesmo estágio de desenvolvimento fisiológico, na presença (●) e na ausência (○) de 50 mM de NaCl 59

Capítulo 3 Controle fonte-dreno da mobilização das reservas orgânicas de cotilédones durante o estabelecimento da plântula de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) sob salinidade com NaCl

Figura 01 – Esquema de extração para determinação de amido em cotilédones. Extração de açúcares solúveis totais e aminoácidos livres totais em cotilédones e folhas 73

Figura 02 – Efeito do NaCl na variação da matéria seca nos cotilédones (a) e eixos em crescimento (b) durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro. (○) controle; (●) 50 mM NaCl 76

Figura 03 – Efeito do NaCl na variação do conteúdo de proteínas (a), lipídios (b), amido (c) e açúcares solúvel (d) nos cotilédones de plântulas de cajueiro ao longo da mobilização das reservas. (○) controle; (●) 50 mM NaCl. 77

Figura 04 – Efeito do NaCl na mobilização das reservas de globulinas (a), albuminas (b) e prolaminas (c) nos cotilédones, durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro.(○) controle; (●) 50 mM NaCl 78

Figura 05 – Efeito do NaCl na variação do conteúdo de aminoácidos livres totais (a), prolina (b), arginina (c) ornitina (d), glutamina (e) e asparagina (f) nos cotilédones durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro (○) controle; (●) 50 mM NaCl 79

Capítulo 4 Introdução ao estudo das proteases e proteínas de reservas em cotilédones de plântulas de cajueiro na presença de NaCl

Figura 1. Atividade azocaseinolítica *in vitro* total (a), proteínas solúveis totais (b) e resposta inibitória *in vitro* dos inibidores de proteinase específicos (c, d, e, f) de cotilédone das plântulas de cajueiro sob tratamento controle e salino..... 95

Figura 2. Atividade gelatinolítica em PAGE-nativo das proteases cotiledonares das plântulas de cajueiro sob tratamento controle e salino, em gel (zimograma) incubado com diferentes inibidores de proteinases (E-64, EDTA, Pepstatina e PMSF) 96

Figura 3. Perfil eletroforético PAGE-SDS de proteínas cotiledonares das plântulas de cajueiro sob tratamento controle (C) e sob estresse salino (E) aos 4, 8, 12, 16, 20 e 24 dias após o semeio	98
Figura 4. Eletroforese PAGE-SDS (2-D) das proteínas totais de cotilédones de plântulas de cajueiro 12 dias após o semeio sob o tratamento salino (a). Zimograma 2-D das proteínas solúveis de cotilédones de plântula de cajueiro 24 dias após o semeio sob tratamento controle	99
Figura 5. Ponto isoelétrico e massa de precursores das proteases serínicas, subunidade glutelínica e cadeia alfa da globulina de diferentes espécies de plantas. Fonte: http://www.expasy.org/cgi-bin/tagident0.pl	100
Figura 6. Perfil eletroforético PAGE-SDS (2-D) de proteínas totais cotiledonares das plântulas de cajueiro sob tratamento controle (A, B, C, D) e sob tratamento salino (a, b, c, d) aos 12, 16, 20 e 24 dias após o semeio (tempo dependente)	101

Controle Fonte-Dreno da Mobilização de Reservas Durante a Germinação e Estabelecimento de Plântulas de Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) expostas à salinidade

Autor: LUIZ FERREIRA AGUIAR PONTE

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

RESUMO

Nesse trabalho, os efeitos da salinidade (NaCl) na mobilização de reservas em cotilédones foram estudados durante a germinação e estabelecimento de plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). As castanhas de caju foram semeiadas em vermiculita, saturada e irrigada com água destilada (controle) e solução de NaCl 50mM. Os cotilédones das plântulas sob tratamento controle e salino foram retirados aos 10, 14, 18, 22, 26 e 30 dias após o semeio (DAS), seguindo os respectivos estádios fisiológicos: I- emissão da radícula, II- emissão das folhas primárias (FP), III- expansão das FP, IV- FP totalmente expandidas, V- expansão das folhas secundárias (FS), VI- folhas secundárias totalmente expandidas. O tratamento salino diminuiu o crescimento inicial das plântulas como a mobilização da massa seca foi retardada nos cotilédones das plântulas tratadas com sal. Ocorreu um atraso no crescimento, durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro anão-precoce tratadas com NaCl 50mM, ocasionado pelo efeito osmótico e não pelo efeito tóxico direto do íon Na⁺. Durante os estádios iniciais (do I ao III), o efeito mais pronunciado do NaCl foi na mobilização de proteínas, enquanto que a mobilização de lipídios e a acumulação de amido e açúcares solúveis foram intensa nos cotilédones de plântulas controle e tratadas com sal. O efeito mais nocivo do NaCl na mobilização de reservas foi verificado durante os últimos estádios (do IV ao V), quando ocorreu um proeminente retardo na mobilização de todas as reservas, principalmente proteínas. Globulinas foram as principais proteínas de reserva dos cotilédones de caju, elas foram intensamente mobilizadas em ambos os tratamentos, notavelmente durante o crescimento inicial das plântulas (até o estágio IV). Em

contraste, prolaminas mostrou uma mobilização mais lenta, seguida pela albuminas em ambos os tratamentos. Adicionalmente os cotilédones das plântulas tratadas com sal acumularam aminoácidos livres nos últimos estádios do estabelecimento das plântulas, principalmente arginina, glutamina e asparagina. Dessa maneira, parece que a salinidade com NaCl atrasou a mobilização de reservas cotiledonares por um possível mecanismo retroalimentação fonte-dreno envolvendo uma diminuição da translocação dos produtos de hidrólise, especialmente aminoácidos, devido a diminuição da força nas regiões dreno, especialmente das folhas jovens. A principal proteína de reserva encontrada nos cotilédones de plântulas de cajueiro foi do tipo globulina, com massa próximo de 22kDa e ponto de focalização isoeletrica entre 4.4 e 5.3. A principal atividade proteínica responsável pela mobilização das reservas protéicas é do tipo serínica, existindo também atividade cisteínica e aspárticas. Existe um atraso da atividade enzimática e da mobilização das proteínas cotiledonares sob tratamento salino, ocasionado possivelmente pela menor força de dreno do eixo em crescimento quando comparado com o tratamento controle.

Sink-source relation as control of the reserve mobilization during the germination and establishment of cashew seedlings (*Anacardium occidentale* L.) under NaCl-salinity

Author: LUIZ FERREIRA AGUIAR PONTE

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

ABSTRACT

In this work, the effects of NaCl-salinity on cotyledonary reserve mobilization were studied during the establishment of cashew seedlings (*Anacardium occidentale* L.). The cashew nuts were sown in saturated vermiculite and irrigated daily with distilled water (control) or 50 mM NaCl solution. The cotyledons of both untreated and salt-treated seedlings were harvested at 10, 14, 18, 22, 26, and 30 days after sowing (DAS), following the respective physiological stages: I- root protrusion, II- emission of primary leaves, III- expansion of primary leaves, IV- primary leaves fully expanded, V- expansion of secondary leaves, and VI- secondary leaves fully expanded. The salt treatment decreased the initial seedling growth as dry matter mobilization was delayed in the cotyledons of salt-treated seedlings. During the initial stages (from I to III), the more pronounced effect of NaCl was on protein mobilization whereas lipid mobilization and starch and soluble sugar accumulation were intense in the cotyledons of salt-treated and control seedlings. The more harmful effect of NaCl on reserve mobilization was verified during late stages (from IV to V), when occurred a prominent delay in the mobilization of all reserves, mainly proteins. Globulins were the main storage proteins of cashew cotyledons and they were mobilized intensively in both treatments, notably during early seedling growth (until stage IV). In contrast, prolamins showed the slowest mobilization, followed by albumins in both treatments. Additionally, the cotyledons of salt-treated seedlings accumulated free amino acids at late seedling establishment, mainly arginine, glutamine and asparagine. In this manner, it seems that NaCl-salinity delayed cotyledonary reserve mobilization by a possible sink-source feedback mechanism involving a decreased translocation of hydrolysis products, especially amino acids, due to the decreased strength of the sink regions, especially the young leaves.

Resposta ao Estresse Salino: da Germinação à Planta Adulta

1.1 Introdução

O estresse salino induz diversas alterações no metabolismo das plantas, sendo a rápida e acentuada redução no crescimento um dos seus efeitos mais marcantes. Os mecanismos bioquímicos que controlam essa diminuição no processo de crescimento ainda não estão completamente elucidados, onde a alta concentração de sais no solo pode provocar a diminuição do potencial hídrico do solo que promove a perda de água das células para o meio externo por osmose diminuindo o turgor. A alteração do potencial hídrico causado por condições hiperosmóticas (alta concentração de solutos no meio externo) pode ocasionar a redução do crescimento da planta. No entanto, a contribuição precisa dos processos de inibição da divisão e expansão celulares e da aceleração da morte celular ainda não foi completamente esclarecida (Munns, 1993; Yeo, 1998).

Distúrbios na organização das membranas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), produção de metabólitos tóxicos, inibição da fotossíntese e diminuição na obtenção de nutrientes são as alterações iniciais mais drásticas causadas pelo estresse hiperosmótico (Winicov, 1998). Além disso, as altas concentrações de sais no solo causam também um estresse hiperiônico (excesso de íons tóxicos) e a consequência de ambos (estresse hiperosmótico e estresse hiperiônico) pode ser altamente danosa para a planta. O estresse iônico causa um desequilíbrio de íons não apenas de Na^+ e de Cl^- , mas também de K^+ e de Ca^+ (Zhu, 2001, Chen e Plant, 1999; Yeo, 1998).

O efeito do estresse salino sobre a germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas tem sido exaustivamente estudado tanto em espécies cultivadas (Redmann, 1972; Prisco e Vieira, 1976; Prisco *et al.*, 1981; Hampson and Simpson, 1989; Al-Niemi *et al.*, 1992; Huang and Redmann, 1995; Wahid *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2003; Misra e Dwivedi, 2004; Joshi *et al.*, 2005) quanto em espécies nativas (Khan e Ungar, 1984; Myers e Morgan, 1989; Katembe *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Gulzar e Khan, 2001; Ramoliya e Pandey, 2002; Ramoliya e Padey, 2003; Ye *et al.*, 2005). Em algumas espécies vegetais, como sorgo, trigo e caupi, os efeitos da salinidade são mais acentuados durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. Em outras espécies, os efeitos da salinidade são mais drásticos após o estabelecimento da plântula e início da fase de plena atividade fotossintética das folhas (Fageria e Gheyi, 1997).

Estudos dos mecanismos induzidos pela salinidade sobre os processos bioquímicos e fisiológicos da germinação e estabelecimento de plântulas do caju são escassos, e os grupos de pesquisas existentes ainda são poucos, principalmente quando as condições de estresse são avaliadas.

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

1.2 Processos de germinação, estabelecimento de plântulas e mobilização de reservas de sementes

A germinação é o reinício do crescimento do embrião, o qual foi paralisado nas fases finais da maturação da semente. Este processo fisiológico se inicia com a embebição e a reativação do metabolismo do embrião, culminando com a protrusão da radícula através dos envoltórios da semente (Cocucci e Mariath, 2004). Do ponto de vista metabólico, ocorre aumento da respiração, biossíntese de enzimas, hidrólise de reservas e transporte ou assimilação de produtos de hidrólise, permitindo o crescimento e a diferenciação dos tecidos (Buckeridge et al., 2000).

As giberelinas (GAs) são fitohormônios produzidos pela radícula do embrião e translocado para o endosperma, onde se ligam a receptores de membranas que interagem provavelmente com proteínas-G também associadas à membrana plasmática. Estes fitormônios parecem promover a germinação suprimindo a ação de fatores de transcrição, inibidores da germinação, como também são ativadores de genes que atuam na promoção da germinação e na repressão da dormência embrionária (Russel et al, 2000).

Sinais específicos do ambiente são traduzidos por sinais internos na semente que induzem a síntese e ativação das giberelinas (ácidos giberélicos), que, por sua vez, induzem a síntese e ativação de enzimas hidrolíticas (mananase, poligalacturonase, celulase, arabinosidase e expansina) responsáveis pela degradação das paredes de células do endosperma, enfraquecendo e afrouxando o

tecido na cápsula do endosperma, de modo a permitir a protrusão da radícula (Bradford *et al.*, 2000).

Resultados indicam que as giberelinas agem tanto na quebra da dormência, por atuar no silenciamento de genes envolvido na manutenção da dormência (Koornneef *et al.*, 2002), como na progressão do alongamento embrionário por promover a síntese de enzimas (proteínases) envolvidas na mobilização de reservas (Bewley, 1997). Essas observações têm colocado as giberelinas como principal agente envolvido na quebra da dormência em sementes (Peng e Harberd, 2002). Tais resultados sustentam a hipótese de que tanto o silenciamento de genes envolvidos na dormência como a remoção de polipeptídeos inibidores da germinação (fatores de transcrição) fazem parte do processo de remoção da dormência em sementes.

Logo após a germinação, se inicia o processo de estabelecimento da plântula. Durante este processo, ocorre o crescimento heterotrófico da plântula a expensas de compostos de reserva até o estabelecimento do metabolismo autotrófico (Melo *et al.*, 2004). Dentre os compostos de reserva armazenados em sementes, encontram-se polissacarídeos, como amido, xiloglucanos e galactomananos, além de lipídeos e proteínas (Buckeridge *et al.*, 2000).

Após a protrusão da raiz (germinação propriamente dita) a plântula em crescimento tende a buscar a autotrofia retirando água e nutrientes do solo, e realizando fotossíntese. Entretanto até esse momento, o crescimento da plântula é abastecido pelos carboidratos derivados das reservas da semente. Tanto o amido como os lipídeos são convertidos em sacarose, que é requerido como fonte de energia para o crescimento. Nesse estágio a plântula em crescimento é um organismo heterotrófico que sobrevive da disponibilidade de energia dos tecidos de reserva da semente (De Castro e Hilhorst, 2000).

As reservas podem ser classificadas em dois tipos: reservas de produção principal de energia (usadas no início da germinação) e reservas de transferência de matéria (usadas pelas plântulas em crescimento). Açúcares (sacarose e oligossacarídeos da série rafínósica) são encontrados em todos os vacúolos de todas as células nas sementes, sendo estes responsáveis pelo suprimento energético para iniciar o processo de reidratação, reparo de tecidos e desenvolvimento do embrião. A degradação destes açúcares é realizada por hidrolases sintetizadas durante a maturação das sementes, pois as mesmas foram

encontradas em sementes quiescentes. É durante ou a partir desse ponto que tem início ao crescimento embrionário, cujo fim é produzir um indivíduo autotrófico (Bewley, 2001).

Como a mobilização das reservas tem a finalidade de subsidiar o crescimento e o desenvolvimento, é essencial que os dois processos sejam sincronizados. De modo geral, a mobilização das reservas inicia a partir de um sinal que vem do embrião (no caso de cereais, giberelinas e em leguminosas a auxina). Com isso o processo de degradação dos compostos de reservas tem início pela ativação da transcrição dos genes que originam as hidrolases, e conseqüente produção e transporte das enzimas até o local de ação (Bewley, 2001).

O metabolismo dos compostos de reserva acaba gerando uma grande quantidade de sacarose e aminoácidos nos tecidos de reserva, e estes são transportados para os tecidos em crescimento. Em alguns casos em que o desenvolvimento da plântula leva vários dias, a mobilização de reservas pode apresentar sincronismo com a fotossíntese durante o estabelecimento nas folhas em expansão (Buckeridge *et al.*, 2000).

1.3 Salinidade e seus efeitos durante a germinação e estabelecimento de plântulas

O estresse salino inibe ou retarda a germinação das sementes e o crescimento das plântulas devido a efeitos osmóticos e/ou iônicos. O primeiro distúrbio fisiológico causado pelo estresse salino é a restrição da captação de água devido à diminuição do potencial osmótico do substrato, retardando a embebição das sementes ou o alongamento da raiz (Redmann, 1972; Wahid *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Ramoliya e Pandey, 2002; Ramoliya e Pandey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2005).

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

1981; Ashraf *et al.*, 2003), a captação de nutrientes (Ashraf *et al.*, 2003; Ramoliya *et al.*, 2004) e a acumulação de solutos compatíveis (Thakur e Sharma, 2005).

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

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

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

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

Plântulas de arroz tratadas com NaCl sofreram parada de crescimento e expressaram seis proteínas abundantes na embriogênese tardia (proteínas LEA). Em adição, o crescimento das plântulas foi retomado e estas proteínas foram degradadas durante tratamento de recuperação. Desta forma, a salinidade causada pelo NaCl induziu a expressão de proteínas LEA, as quais podem estar associadas à parada de crescimento das plântulas (Chourey *et al.*, 2003).

Plântulas submetidas ao estresse salino também podem sofrer danos oxidativos causados por alterações no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (Sreenivasulu *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2005). Sreenivasulu *et al.* (1999) estudaram a peroxidação de lipídeos, a expressão e a atividade de peroxidases em plântulas de duas cultivares de *Setaria italica* tratadas com NaCl. As plântulas da cultivar considerada resistente apresentaram menor peroxidação de lipídeos e maior atividade de peroxidase que as plântulas da cultivar considerada sensível sob tratamento salino. As plântulas da cultivar resistente também expressaram uma isoforma específica de peroxidase ácida, a qual pode apresentar algum papel importante na homeostase redox durante o estresse salino. Além disso, Tsai *et al.* (2005) verificaram alterações na expressão e na atividade de ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona redutase (GR) em raízes de plântulas de arroz submetidas a tratamentos com NaCl e H₂O₂. Ambos os tratamentos causaram aumento do conteúdo endógeno de H₂O₂ associado a um aumento da atividade de APX e GR. No entanto, apenas o tratamento com NaCl foi capaz de induzir a expressão destas enzimas, indicando que H₂O₂ não deve atuar como sinalizador.

Em plântulas de girassol expostas a concentrações externas crescentes de NaCl, ocorreu acúmulo de Na⁺ e Cl⁻ em cotilédones e principalmente em eixo embrionário (Ashraf *et al.*, 2003). Em contrapartida, ocorreu diminuição do conteúdo de K⁺ e Ca²⁺ em eixo embrionário, provavelmente associado a translocação reduzida

destes íons a partir dos cotilédones. Assim, a salinidade causada por NaCl pode ter prejudicado o crescimento das plântulas de girassol pela interferência na redistribuição de K^+ e Ca^{2+} oriundos dos cotilédones. Adicionalmente, plântulas de *Salvadora persica* expostas ao estresse salino apresentaram diminuição do conteúdo de nitrogênio, fósforo, magnésio, zinco e ferro em raízes, caule e folhas, assim como diminuição do conteúdo de potássio e manganês em raízes durante o tratamento (Ramoliya *et al.*, 2004). Neste caso, o solo salinizado com cloretos e sulfatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio causou distúrbios tanto na captação quanto na distribuição de macro e micronutrientes.

Existem evidências de que o estresse salino provoca alterações no metabolismo hormonal de plântulas em estabelecimento (Zapata *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005). Sementes de alface germinadas sob tratamento salino apresentaram aumento da taxa de respiração e da evolução de etileno, além de alterações no balanço de poliaminas (Zapata *et al.*, 2003). Assim, a evolução de etileno e a síntese das poliaminas espermidina e espermina podem estar associadas à resistência ao estresse salino. Além disso, a germinação de sementes de *Suaeda salsa* sob tratamentos salinos foi estimulada por 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC, precursor do etileno), GA_4 (giberelina) e 6-benzil-adenina (6-BA, auxina sintética). Novamente, a evolução de etileno parece ter algum papel na resistência ao estresse salino. É provável que ACC, GA_4 e 6-BA tenham um efeito promotor da germinação atuando como antagonistas do ABA, cuja síntese é induzida sob estresse salino.

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

Em muitos trabalhos realizados com espécies cultivadas, os autores consideram as cultivares testadas como sensíveis ou resistentes ao estresse salino de acordo com as respostas fisiológicas apresentadas no decorrer ou após a germinação. Redmann (1972) estudou a germinação de três cultivares de alfafa submetidas ao estresse osmótico promovido por polietilenoglicol (PEG) e manitol e

ao estresse salino causado por NaCl, KCl, MgCl₂, Na₂SO₄, K₂SO₄ e MgSO₄. Este autor utilizou a porcentagem de germinação como critério para discriminar as cultivares testadas como sensíveis ou resistentes a estes estresses. Al-Niemi *et al.* (1992) verificaram o efeito de concentrações externas crescentes de NaCl sobre a germinação e o crescimento inicial de 86 cultivares de alfafa. Estes autores verificaram alterações na porcentagem de germinação, na altura das plântulas, no número de ramos por plântula, na massa seca de raízes e parte aérea e na razão entre a parte aérea e as raízes. Cultivares consideradas resistentes durante a germinação, devido a maiores porcentagens de germinação sob estresse salino, não necessariamente geraram plântulas consideradas mais resistentes, ou seja, com maior massa seca na parte aérea ou maior número de ramos.

Huang e Redmann (1995) compararam o desempenho de três cultivares de cevada sob estresse osmótico promovido por PEG e estresse salino causado por NaCl ou Na₂SO₄ + MgSO₄, verificando a porcentagem e o índice de velocidade de germinação, além do comprimento das raízes e da parte aérea das plântulas obtidas. De acordo com estes parâmetros, as cultivares testadas apresentaram maior sensibilidade ao estresse osmótico, seguido do estresse salino causado por NaCl, tanto no decorrer da germinação quanto durante o estabelecimento das plântulas. Wahid *et al.* (1998) estudaram o efeito do pré-tratamento com NaCl sobre o estabelecimento de plântulas de uma cultivar de sorgo. Mesmo sendo considerada moderadamente resistente ao estresse salino, esta cultivar apresentou plântulas com redução no conteúdo de massa fresca e massa seca e com aumento do conteúdo de Na⁺, Cl⁻, prolina e açúcares livres, conforme o aumento da concentração externa de NaCl.

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

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

1.4 Salinidade e seus efeitos nas plantas adultas

A salinização dos solos tem origem diversa, sendo que, entre os fatores naturais, os mais importantes são o material de origem e o clima. No primeiro caso, a intemperização química dos minerais e rochas da crosta terrestre é a principal fonte responsável pela liberação e distribuição de íons (Daker, 1988). Assim, o halomorfismo naturalmente induzido ao solo é consequência de processos pedogenéticos específicos.

A concentração salina da solução do solo, antes da ação antrópica, é definida como salinização primária. A salinização induzida é decorrente do manejo inadequado do solo e da água em práticas agrícolas (Santos e Muraoka, 1997). As áreas naturalmente salinas do mundo compreendem aquelas que são constantemente inundadas pelas águas salgadas de lagos e, principalmente, dos mares (áreas de manguezais nas costas tropicais e subtropicais), os desertos salinos e pequenas áreas próximas a depósitos de sais (Chapman, 1975; Cardoso, 2000). Também influencia na salinização dos solos a dependência da relação entre infiltração e evaporação. Se a infiltração for maior, os solos são lixiviados e, com facilidade se acidificam. Se a evaporação predomina, ocorre o contrário, acumulam-se sais na camada superior dos solos e, com facilidade se salinizam. Para salinizar um solo não é necessária água salina no subsolo, nem calor muito grande. A água doce contém sais e, como em zonas áridas a água do subsolo sobe e evapora, ou é

absorvida pelas plantas, falta o movimento descendente. A água deposita seus sais excedentes na camada superficial do solo e, com o tempo, estes se acumulam, tornando salinos os solos do semi-árido. Isso ocorre tanto mais rapidamente quanto mais alto for o nível freático (Primavesi, 1987).

Os sais solúveis consistem, normalmente de várias proporções dos cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- e, às vezes de K^+ , CO_3^{2-} e NO_3^- . O problema da salinidade existe quando os sais acumulam-se na zona radicular em uma concentração tal que não permita que a planta retire água suficiente, provocando, assim, estado de deficiência de água por tempo significativo, que pode se estender até causar sintomas na planta muito semelhantes aos provocados pela estiagem (Ayers e Westcot, 1991).

Os solos considerados salinos contêm sais solúveis em quantidades suficientes para interferir no desenvolvimento da maioria das espécies cultivadas. Obviamente, não é possível referir-se a uma determinada quantidade de sais, pois a situação depende da espécie da planta, da textura do solo, da capacidade de armazenagem de água no solo e da composição dos sais (Meneses Júnior, 2002).

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

1.4.1 Efeitos iônicos e toxicidade

As altas concentrações de sais no solo causam um estresse hiperiônico (excesso de íons tóxicos) e a consequência deste estresse juntamente ao estresse osmótico acaba por ser altamente danosa à planta. O estresse iônico causa um

desequilíbrio de íons, não somente de Na^+ e Cl^- , mas também de K^+ e de Ca^{2+} (Yeo, 1998; Chen e Plant, 1999; Zhu, 2001). Em substratos salinos o Na^+ e o Cl^- são, freqüentemente, os íons dominantes. Apesar da necessidade de Cl^- como micronutriente para as plantas superiores e do Na^+ para muitas halófitas e algumas espécies C_4 , a concentração de ambos os íons em substratos salinos excede esta demanda e leva a toxicidade em plantas não tolerantes ao sal. Em diversas culturas herbáceas e frutíferas a inibição do crescimento e a injúria à folhagem (cloroses marginais e necroses nas folhas maduras) ocorrem mesmo em baixos níveis de salinização de NaCl (Maas, 1993).

Embora a toxicidade ao Cl^- seja muito comum em muitas espécies de plantas cultivadas em substratos salinos em algumas espécies de plantas, tais como o sorgo, comparado ao cloreto (NaCl), a salinização com o sulfato (Na_2SO_4) pode reduzir o crescimento do mesmo modo que o NaCl em baixas concentrações. Esse decréscimo no crescimento é, em parte, devido à redução na concentração de potássio e magnésio em salinização elevada com sulfato (Boursier e Läuchli, 1990). Com exceção de algumas gramíneas, como o trigo, sorgo e arroz, a toxicidade do Na^+ não parece ser tão acentuada quanto à do Cl^- e está mais relacionada à baixa concentração de cálcio ou aeração deficiente no substrato. Diversas culturas com baixa tolerância ao sal são “excluidoras” de Na^+ e capazes de restringir, em níveis baixos e moderados de salinidade, o transporte de Na^+ para as folhas, onde ele é altamente tóxico em espécies sensíveis ao sal. (Yeo *et al.*, 1977).

1.4.2 Principais respostas adaptativas das plantas ao estresse salino

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

aumento da capacidade das plantas sobreviverem a condições adversas, em decorrência de alterações morfofisiológicas definitivas provocadas pela seleção evolucionária (natural ou artificial) de genes.

1.4.3 Compartimentalização de íons tóxicos

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

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

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

pelo Na^+ em várias funções metabólicas (Gorham *et al.*, 1985). O crescimento aumenta com a salinidade e os níveis de Na^+ e Cl^- aumentam nos tecidos mas os níveis de K^+ e Ca^{2+} diminuem devido à competição catiônica. Nas glicófitas o mecanismo predominante é o de exclusão (Greenway e Munns, 1980). O acúmulo tóxico de Na^+ e Cl^- nas folhas tem sido correlacionado ao fechamento de estômatos e a fatores não estomatais, tais como redução no conteúdo clorofílico, ambos limitando a quantidade de produção de fotoassimilatos (Romero-Aranda e Syvertsen, 1996).

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

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

1.4.4 Acumulação de íons inorgânicos

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

água e da pressão de turgescência da célula, o que pode contribuir para a manutenção de processos fisiológicos, tais como: fechamento estomático, fotossíntese, alongamento e divisões celulares (Serraj e Sinclair, 2002).

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

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

1.4.5 Absorção de água e crescimento continuado

A quantidade de água transportada do solo até as folhas é proporcional ao gradiente de potencial hídrico e inversamente proporcional ao somatório das resistências apresentadas (Lacerda, 1995; Cardoso, 2000). Considerando as plantas adaptadas e ajustadas osmoticamente ao estresse salino, o gradiente de potencial pode ser mantido, associado à redução na condutividade hidráulica das raízes e maior fechamento dos estômatos. Isso resultará em menores taxas de absorção e assimilação de CO_2 , induzindo menores taxas de crescimento (Azaizeh *et al.*, 1992). Em muitas ocasiões, as folhas das plantas estressadas com a salinidade, mas

previamente ajustadas, apresentam aspecto normal, sendo, em geral, menores e mais tenras (maior relação massa úmida/área). Assim, nesses casos, a pressão de turgescência não é diminuída pelo estresse salino (Boyer, 1965).

No entanto, em geral, os níveis de salinidade e área foliar geralmente estão inversamente relacionados. Reduções drásticas de fixação e acumulação de CO₂ por unidade de área foliar, perda de turgor de células mesofílicas por meio de acumulação de sais no apoplasma ou pelo efeito tóxico dos íons podem ser evidenciadas. Por exemplo, em folhas de *Citrus* (Behboudian *et al.*, 1986) e trigo (Huang *et al.*, 1994).

1.5 Respostas de cultivares ao estresse salino

A seleção de genótipos de uma espécie para tolerância à salinidade é problemática, pois a seleção dirigida a uma situação ambiental pode não resultar em seleção correta para um outro ambiente. Em condições de campo, um ambiente profundamente heterogêneo é encontrado, não apenas para o teor de sal no solo, mas para outros fatores como sodicidade, pH e possibilidade de elementos tóxicos (Rengasamy, 2002).

Salinidade traz um grau de complexidade à estimação de produção agrícola, não apenas pelos cultivos serem conduzidos em ambientes não controlados por longos períodos de tempo, mas devido ao fato da simples conversão de biomassa vegetativa em rendimento de grão ser complexa. Um reduzido nível de salinidade pode não interferir no rendimento de grão, mesmo que a área foliar e a biomassa vegetativa sejam reduzidas. Um estudo de tolerância à salinidade de espécies cultivadas pelo *US Salinity Laboratory* (Mass e Hoffman, 1977; Usda-Ars, 2005) apresenta, para cada espécie estudada, um nível inicial de salinidade abaixo do qual não há redução na produtividade. Além disso, o estudo traz uma correlação linear entre produtividade e aumento da salinidade (relação *bent stick*, ou “vara curvada”). Entretanto, na maioria dos casos, os dados são expressos para um único cultivar da espécie, ou um número limitado de cultivares, número este não representativo da espécie, pois esta apresenta uma ampla diversidade genética. Contudo, várias abordagens têm sido pesquisadas no sentido de melhorar a tolerância à salinidade, principalmente de monocotiledôneas, pela introdução de genes de tolerância em cultivares adaptadas. Inclui-se aí ampla seleção a partir de

bancos internacionais de germoplasma, experimentação em campo de cultivares selecionados e métodos convencionais de melhoramento, com cruzamentos não convencionais entre parentais (Munns *et al.*, 2006).

Em arroz, abordagens recentes para a pesquisa de cultivares tolerantes a sal incluem variantes somaclonais, linhas-derivadas e seleção assistida por marcador molecular (Gregorio *et al.*, 2002). Por exemplo, Jafari-Shabestari *et al.* (1995) procederam à seleção de cerca de 400 parentais de trigo em campo irrigado e identificou muitas linhagens que foram consideradas consistentemente promissoras para rendimento de grão e tolerância ao sal. No Paquistão, a linhagem de trigo LU26S mostrou alta produtividade sob salinidade, mas foi susceptível à ferrugem e não mostrou adaptação a solos densamente sódicos (Qureshi *et al.*, 1980). Em trigo, exclusão de Na^+ em folhas, associada à alta relação K^+/Na^+ , tem sido evidenciada como o principal mecanismo de tolerância (Ashraf e Khanum, 1997), embora não englobando todos os genótipos, mostrando que este não é o único mecanismo de tolerância a sal (El-Hendawy *et al.*, 2005).

Em casa de vegetação, uma comparação de respostas à salinidade entre espécies de cereais mostrou pequenas diferenças na produção de biomassa de diferentes cultivares de cevada, trigo e tritcale (Rawson *et al.*, 1988). Aumentos significativos na tolerância ao sal geralmente vêm através da introdução de novos genes, tanto por cruzamentos por novos doadores de germoplasma, ou por transformação por um gene único. Nos dois casos, a progênie deve ser retrocruzada com cultivares adaptados. Um entendimento dos mecanismos genéticos e fisiológicos é necessário para o programa de melhoramento, em vista de selecionar os genótipos mais promissores (Munns *et al.*, 2006). Características de tolerância à salinidade incluem exclusão de Na^+ , relação favorável de K^+/Na^+ , retenção de íons, tolerância tecidual, partição de íons em folhas em diferentes estádios, ajustamento osmótico, eficiência da transpiração, vigor e floração precoces e o aumento tardio da eficiência do uso de água (EUA) (Colmer *et al.*, 2005). Uma listagem de genes individuais relacionados à regulação desses processos é apresentada em Munns (2005).

Sal na água de irrigação inibe o crescimento da planta por duas razões: 1) a presença de sal na solução do solo reduz a habilidade da planta em absorver água, levando a um crescimento mais lento. Este é o efeito osmótico ou efeito de déficit hídrico causado pela salinidade. 2) quantidades excessivas de sal

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

Uma falta de correlação entre produção bruta e produtividade, numa comparação de 38 genótipos de trigo e outros cereais, foi evidenciada por Richards *et al.* (1987) que concluiu que o modo mais eficiente de selecionar melhores genótipos para tolerância à salinidade é testando os mesmos a baixa salinidade. Também, é sugerido que experimentos de campo não são apropriados para seleção de grande número de genótipos, especialmente germoplasma exótico, pois seus rendimentos serão influenciados fortemente pela floração e pelo tempo de maturação, tanto por outros fatores como resistência a pragas e doenças, além do alto custo de promover homogeneidade entre os blocos em experimentos de campo (Munns *et al.*, 2006). Para obter-se aumento na tolerância ao sal, atenção tem sido dada à identificação de novas fontes genéticas para baixas taxas de absorção de Na⁺ até a folha. Menos atenção tem sido dada a fontes de genes de tolerância a altas concentrações de Na⁺ em folhas, provavelmente devido à dificuldade de quantificação das técnicas relacionadas. Fontes potenciais de tolerância a altas concentrações internas de Na⁺ foram identificadas em arroz (Yeo *et al.*, 1990) e trigo duro (Munns e James, 2003). Avanço na tolerância ao sal de espécies irá indubitavelmente resultar da interação próxima entre geneticistas e fisiologistas, associados à experiência de melhoristas de plantas e agricultores (Munns *et al.*, 2006).

1.6 O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)

A posição sistemática do gênero *Anacardium*, de acordo com Bailey (1942), é:

IV divisão: Spermatophyta
II sub-divisão: Angiospermae
I sub-classe: Archichlamidae
39ª ordem: Sapindales
Família: Anacardiaceae
Gênero: *Anacardium*

Anacardium occidentale L., popularmente conhecido como cajueiro, é uma espécie da família Anacardiaceae formada de aproximadamente 74 gêneros e 600 espécies de árvores e arbustos predominantemente tropicais e de subarbustos e trepadeiras subtropicais, sendo raramente encontrados em clima temperado. De modo geral, as plantas são caracterizadas pela presença de condutos, no córtex e no lenho, onde ocorre a formação de resina. As espécies do gênero *Anacardium* são tipicamente tropicais, sendo encontradas na Amazônia (florestas úmidas, matas de galeria e Cerrado), Planalto Central (Cerrado) e Nordeste (Cerrado) do Brasil. Uma exceção é a espécie *Anacardium humile*, encontrada até no Sul do país, no Estado do Paraná e no Nordeste do Paraguai (Mitchell e Mori, 1987).

A. occidentale L. é a espécie de maior dispersão e a única cultivada do gênero, sendo encontrada em todo o mundo tropical. A distribuição natural dessa espécie pode ser confundida pela dispersão por cultivo devido à extensa área de diversidade do gênero na região Amazônica e na do Cerrado, podendo ser encontrada em ecossistemas do Norte e Nordeste do Brasil. É importante salientar ainda, que o cajueiro é encontrado mais abundantemente na região litorânea do Nordeste do Brasil, onde aumenta em estado aparentemente espontâneo, sobretudo na vegetação das praias e dunas. O cajueiro dificulta a colonização por outras espécies, diferentemente do que se observa com outras plantas, como as de Cerrado e as da Floresta Amazônica, que convivem como parte da flora local (Mitchell e Mori, 1987; Lima, 1988; Barros, 1991).

Com a descoberta do cajueiro como opção econômica, iniciaram-se as atividades de pesquisa, obedecendo a diferentes estratégias, de acordo com a época e da orientação seguida pelas instituições de pesquisa no país. É possível organizar cronologicamente as atividades de melhoramento genético no cajueiro, no

Brasil, em cinco fases distintas: 1) século XVII, onde o pendúculo e a castanha eram utilizados para fins culinários pelos nativos; 2) décadas de 40 e 50, marcado pela exploração do LCC e transformação do pendúculo em diversos produtos; 3) décadas de 60 e 70, foi a fase dos grandes plantios comerciais em decorrência de um programa de expansão da cajucultura, a partir de incentivos governamentais de fomento à cultura; 4) descobertas dos Clones do tipo comum e anão precoce, o que culminou com a recomendação dos clones CCP 06, CCP 76, CCP 09 e CCP 1001, todos do tipo anão precoce, para o plantio comercial e 5) fase em andamento, prioriza as pesquisas para atender às demandas atuais da cajucultura, com enfoque na fruticultura irrigada e no aproveitamento, também, do pedúnculo para o consumo *in natura* (Paiva *et al.*, 1997).

Os primeiros colonizadores, ao chegar ao Brasil, observaram que o cajueiro era uma importante fonte de subsistência dos índios. Do cajueiro era aproveitado o caju, denominação da maçã do cajueiro, tanto *in natura* como nas formas de sucos e bebidas fermentadas. Além disso, a amêndoa era consumida após a assadura da castanha, o verdadeiro fruto, bem como subprodutos da casca e das folhas da planta que eram utilizadas como recursos medicinais (Johnson, 1974; Lima, 1988). O uso culinário e as qualidades nutricionais e medicinais do cajueiro conquistaram os colonizadores e exploradores os quais visualizaram na planta elevado potencial de exploração mercantil (Johnson, 1974).

Após ser integrada aos hábitos alimentares do Brasil – Colônia, bem como de outros países tropicais, a cultura passou vários séculos caracterizada pela exploração extrativista ou por plantio desordenado e em consórcio com culturas anuais (Parente *et al.*, 1991). Atualmente, o aproveitamento da planta é completo. As raízes e as cascas do caule e das ramificações são aproveitadas no uso medicinal, no combate a hemorragias, diarreia, úlceras, asma e como diurético. A resina extraída do tronco é utilizada nas encadernações devido à sua ação repelente ao inseto ou como alternativa ao uso das gomas-arábicas (Johnson, 1974; Soares, 1986; Lima, 1988; EMBRAPA, 1994). A goma também é utilizada na indústria de panificação, de sorvetes, de salsicharia e de cervejarias como estabilizante de espumas (EMBRAPA, 1994). As folhas têm ação medicinal na terapêutica de avitaminoses de escorbuto infantil e de ginecopatias comuns (Mota, 1982; Lima, 1988). O pericarpo da castanha é utilizado para extração do líquido da castanha de caju (LCC), cujo número de patentes de aplicação industrial ultrapassa 200, desde a

sua utilização na indústria de plásticos até a indústria automotiva, que utiliza o LCC nas formulações de lonas de freios (Telles, 1988).

A película da amêndoa é utilizada na composição de rações para aves e bovinos em virtude dos teores de proteínas e de carboidratos adequados. A amêndoa (cotilédones e eixo embrionário) é o principal produto do cajueiro, consumida tanto na forma assada e salgada como na confecção de bolos, doces e chocolates, em face do seu elevado valor nutritivo. O pseudofruto é consumido tanto *in natura* como processado, como suco turvo integral ou sucos clarificados, denominados de cajuínas (Soares, 1986; Lima, 1988).

De todos os produtos obtidos do cajueiro, a principal fonte de divisas para a região Nordeste é a exportação da castanha. Mais de 98% da área ocupada com cajueiro no Brasil se encontra na região Nordeste. Deste total, 80% são cultivados nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. O Ceará foi responsável, em 2001, por aproximadamente 55% da produção nacional, gerando mais de 300.000 empregos por meio da cadeia produtiva dessa cultura. (Crisóstomo, *et al.* 2001).

Atualmente a agroindústria de caju no Nordeste tem relevante importância sócio-econômica para o país em função da exploração de 677.253 ha de cajueiros, que mobilizam no campo cerca de 280 mil pessoas e proporcionam uma produção de 217.062 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pedúnculo por ano, gerando divisas da ordem de US\$ 143 milhões anuais. Por sua vez, o consumo do caju-de-mesa no mercado interno (caju *in natura*) vem crescendo significativamente, principalmente na região Sudeste, estimulando, ainda que em pequena escala, novos investimentos na expansão e modernização dos pomares e na adoção de boas práticas agrícolas (FIEC, 2004; Oliveira e Andrade, 2005). Apesar disso, essa agroindústria se ressentida de inúmeros problemas relacionados com os segmentos agrícola e industrial. Baixa renovação das áreas plantadas, oscilações de pluviosidade (períodos de seca), baixa qualidade genética dos materiais plantados e pomares produzidos anteriormente a partir de sementes são os principais fatores da baixa produtividade da cultura (Barros *et al.*, 2000).

A expansão da área cultivada, em detrimento do uso de tecnologias apropriadas, provocou prejuízos incalculáveis do ponto de vista social, econômico e ambiental. Como resultado deste modelo de exploração, tem havido um declínio acentuado no rendimento dos pomares. Com isso, a cadeia produtiva do caju

brasileiro, a partir da metade da década de oitenta, vem apresentando sinais evidentes de perda de competitividade (Oliveira; Andrade 2005).

Existem, no Estado, projetos em desenvolvimento para aumentar a produção e produtividade da cultura, tais como a substituição de copas de cajueiro de baixa produtividade através da utilização de clones superiores de cajueiro-anão precoce. Outro projeto é a utilização da irrigação em novas áreas com mudas enxertadas de cajueiro-anão precoce onde a produtividade é superior quando comparada a de condições de sequeiro (Almeida, 2002).

1.7 Efeitos da salinidade no cajueiro

A restrição do crescimento e produtividade das plantas causadas pela salinidade é acentuada em regiões áridas e semi-áridas. As plantas de cajueiro têm desenvolvido vários mecanismos de adaptações fisiológicas e genéticas para superar as condições de estresse ambiental. Embora a tolerância das plantas a salinidade tenha sido atribuída a estes mecanismos, existe um crescimento de evidências sugerindo a existência de um sistema geral de resposta ao estresse em plantas mediado por um via comum de transdução de sinal celular (Silveira *et al.*, 2003).

Plantas jovens de cajueiro foram tratadas durante 30 dias com solução nutritiva contendo zero; 50 ou 100 mol m⁻³ de NaCl. A massa seca da parte aérea das plantas estressadas foi reduzida em 23 e 52%, nos dois níveis de NaCl, respectivamente, enquanto que a massa das raízes foi reduzida somente pelo maior nível de NaCl, em aproximadamente 33% (viégas, *et al.*, 1999).

Também foram realizados estudos com enzimas envolvidas nos mecanismos bioquímicos da produção de prolina na tentativa de entender o acúmulo desse osmoprotetor sob estresse salino. A atividade *in vivo* da redutase de nitrato (RN), em folhas e raízes, foi reduzida de maneira similar em aproximadamente 70%, tanto em 50 quanto em 100 mol m⁻³ de NaCl. Ao contrário, a atividade total de glutamina sintetase (GS) nas folhas aumentou cerca de duas vezes nas plantas estressadas, observando-se variação semelhante para a concentração de proteínas solúveis. Entretanto, os tratamentos com NaCl induziram significativas reduções na atividade de GS e concentração de proteínas solúveis nas raízes (viégas, *et al.*, 1999).

Plantas de cajueiro CCP06 foram cultivadas em vermiculita durante 28 dias e transferidas para solução nutritiva de Hoagland com 10% de sua força iônica, durante 1 e 7 dias, depois suplementada com 200 mM de NaCl por mais 0, 12, 24, 48 e 72 h. As plantas aclimatadas por 7 dias à solução de Hoagland apresentaram sinais fisiológicos mais compatíveis com a tolerância ao NaCl, como menor acumulação de Na⁺ e, também, menores danos nas membranas, peroxidação dos lipídeos, degradação de proteínas, acumulação de aminoácidos livres e acumulação de prolina. Os resultados evidenciam que o tempo de aclimação das raízes à solução nutritiva influencia a expressão de fatores capazes de atenuar os efeitos do estresse salino, provavelmente proteínas relacionadas ao influxo de Na⁺, água e transportadores de Na⁺/K⁺ (Brilhante, *et al.*, 2006).

As concentrações de aminoácidos livres totais, prolina livre e amônia foram aumentadas nas folhas por efeito do NaCl, enquanto que nas raízes permaneceram praticamente inalteradas. Os resultados demonstraram que os efeitos da salinidade induziram respostas diferentes na assimilação de amônia e metabolismo de proteínas entre folhas e raízes. Ao contrário, a atividade da redutase de nitrato (RN) foi reduzida pelo NaCl com intensidade similar nessas duas partes da planta. É possível que o intenso incremento no acúmulo de prolina nas folhas das plantas estressadas possa ter sido relacionado com a maior produção de glutamato através do ciclo GS/GOGAT, a partir da maior disponibilidade de NH₃ e glutamato provenientes de aumentos nos processos de fotorrespiração e catabolismo de proteínas, ambos induzidos pela salinidade (viégas *et al.*, 1999).

Comparações de tolerância dos porta-enxertos CCP 06 e CCP 09 originados de sementes, e das mudas enxertadas CCP 76/CCP 06 e CCP 76/CCP 09, submetidas a estresses hídrico e salino, foram realizadas através de características bioquímicas de folhas. As mudas CCP 76/CCP 06 reproduziram o comportamento de abertura estomática do porta-enxerto CCP 06, que foi mais tolerante aos efeitos dos estresses hídrico e salino do que o CCP 09, apresentando maior capacidade de ajustamento osmótico em presença da salinidade. O potencial hídrico das mesmas demonstrou ser maior nas mudas submetidas ao estresse hídrico do que sob estresse salino. O porta-enxerto CCP 06 teve uma redução de 55,5% da atividade da redutase de nitrato (ARN) quando submetido ao estresse hídrico comparado com controle, e um aumento de 4253% de prolina, sugerindo que

a prolina seja mais um indicador de estresse salino do que elemento de proteção das proteínas. (Matos, *et al.*, 2003).

Meneses Junior (2002) comparou mudas derivadas de sementes de três genótipos de cajueiro (comum, anão-precoce CCP 76 e microcarpo) sob exposição de tempo e dose dependente de NaCl na casa de vegetação. O cajueiro anão precoce foi considerado mais tolerante em resposta ao estresse salino quando analisados o decréscimo relativo de massa seca em raízes, caule e folhas, a exibição de sintomas visuais de toxicidade nas folhas mais acumulação de prolina. De todas as análises realizadas nesse estudo concluiu-se que a intensidade de acumulação de Na^+ e Cl^- e o nível de prolina nas folhas foram capazes de explicar parcialmente a maior sensibilidade ao estresse salino dos genótipos estudados, sugerindo que os caracteres que podem conferir tolerância são interativos e que a maior ou menor tolerância não é devida à expressão de caracteres isolados, mas da interação entre os mesmos.

Na tentativa de identificar o impacto da salinidade sobre a acumulação de íons e solutos orgânicos relacionados com o metabolismo de N, plantas de cajueiro-anão precoce (CCP 06) após 22 dias germinadas foram irrigadas com solução nutritiva contendo 0 (controle), 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl, durante 30 dias. A salinidade reduziu a produção de massa seca total sem, no entanto, provocar alterações importantes no conteúdo de água foliar. As concentrações de Cl^- e Na^+ nos tecidos atingiram níveis tóxicos; as de K^+ aumentaram na parte aérea e foram reduzidas nas raízes. A relação K^+/Na^+ decresceu na parte aérea e nas raízes, com o aumento da salinidade (Morais *et al.*, 2006).

Sintomas visuais de senescência precoce foram observados 10 dias após o início dos tratamentos, fato constatado pela redução dos teores de N total (proteína bruta) e de clorofilas a e b nas folhas e, ainda, por aumentos nas concentrações de prolina e dos demais aminoácidos solúveis totais. Os resultados indicam que as plantas de cajueiro foram sensíveis às concentrações de NaCl utilizadas decorrente, provavelmente, de um forte desequilíbrio iônico com reflexos no metabolismo geral de N (Morais *et al.*, 2006).

Respostas de plantas jovens de cajueiro-anão precoce à salinidade, foram realizadas com mudas enxertadas e irrigadas com soluções salinas de diferentes condutividades elétricas, aplicadas diretamente no ambiente radicular ou sobre as folhas. Os valores da condutividade elétrica da água de drenagem ou do lixiviado

praticamente dobraram em relação àqueles da condutividade elétrica das soluções salinas, independentemente do modo de aplicação da irrigação. Os conteúdos foliares de Na^+ e Cl^- aumentaram com a elevação da salinidade da água de irrigação, com maior expressividade nas plantas irrigadas sobre as folhas (Bezerra *et al.*, 2005).

Os valores de área e matéria seca foliar nas plantas irrigadas via decresceram com o aumento da salinidade na água de irrigação; além disso, com o aumento da salinidade observou-se redução linear nos valores de fotossíntese líquida. Os efeitos deletérios da salinidade foram mais conspícuos quando a solução de irrigação foi aplicada sobre as folhas e as mudas enxertadas parecem aclimatar-se melhor ao estresse salino quando este é aplicado apenas no sistema radicular (Bezerra *et al.*, 2005).

Plantas de cajueiro CP 1001 foram mantidas em solução nutritiva combinada com NaCl 100 mM durante 8 dias (experimento de curta duração) e solução nutritiva combinada com NaCl 50 mM e 100mM durante 30 dias (experimento de longa duração) com finalidade de avaliar a acumulação de prolina e atividade da Glutamina Sintetase. As plantas submetidas ao estresse salino tiveram significativa acumulação de prolina nas folhas, quando comparado com raízes. Essa mudança foi relacionada à atividade das proteases, acumulação de amônia e aminoácidos livres e ao decréscimo do conteúdo de clorofilas e proteínas totais (Silveira *et al.*, 2003).

A atividade da glutamina sintetase também aumentou nas folhas e permaneceu praticamente constante nas raízes de plantas tratadas com NaCl. Embora tenha ocorrido aumento da quantidade de todos os aminoácidos nas folhas de plantas submetidas ao estresse salino, a prolina teve maior percentagem e o glutamato menor percentagem de aumento quando comparado com as concentrações das folhas controle. No mesmo trabalho foram realizados estudos com discos de folhas incubados com NaCl na presença de aminoácidos precursores exógenos envolvidos na síntese de prolina, onde o glutamato foi considerado o aminoácido responsável pela acumulação de prolina quando comparado com os discos incubados com os precursores, mas sem NaCl. Esses resultados reforçam a hipótese, de que, a acumulação da prolina está associada ao aumento da proteólise, da concentração de glutamato e da atividade glutamato sintetase em folhas de planta de cajueiro tratadas com NaCl (Silveira *et al.*, 2003).

Efeitos da salinidade sobre o crescimento e acumulação de solutos inorgânicos foram avaliados em plantas de cajueiro com 30 dias de idade, cultivadas em diferentes doses de NaCl, por 8 dias (curta duração) e 40 dias (longa duração). A produção de massa fresca (MF) da parte aérea, após 40 dias, foi reduzida, aproximadamente, 25 e 75% sob 50 e 100 mM de NaCl, respectivamente. Nas raízes, a produção de MF não foi afetada em 50 mM de NaCl, entretanto decresceu 30% em 100 mM de NaCl. No experimento de curta duração, a concentração de K^+ nos diferentes tecidos foi similar àquela das plantas controle, enquanto que, no experimento de longa duração, a concentração de K^+ foi fortemente reduzida, principalmente nas raízes. Em resposta ao tempo e a salinidade crescente, as concentrações de Na^+ e Cl^- atingiram níveis tóxicos nas folhas o que levou, a partir do quarto dia do estresse salino, ao surgimento de sintomas típicos de toxicidade por estes íons (Viégas *et al.*, 2001).

Poucos são os trabalhos relacionados à mobilização de reservas em cajueiro, principalmente no que se refere ao estresse salino. Almeida (2003) mostrou que 50 mM de NaCl é capaz de reduzir a mobilização de proteínas de reservas do tipo globulinas durante o estabelecimento de plântulas do cajueiro (clone CCP 76). Resultados semelhantes foram obtidos por Giorgini e Campos (1993) trabalhando com café.

Quanto à mobilização de amido e lipídios do cajueiro, a mobilização do amido é menos afetada pelo estresse salino do que a dos lipídeos e, devido um alto teor de lipídios, as sementes do cajueiro se comportam nitidamente como oleaginosas por utilizarem os lipídeos de reserva na síntese de amido e açúcares solúveis, principalmente na fase inicial do estabelecimento das plântulas (Almeida 2003).

Cavalcanti Junior (1994) mensurou a concentração de proteínas e lipídios nos cotilédones e eixo durante a germinação e estabelecimento de plântula. Foi observada uma queda contínua de proteínas e lipídeos no cotilédone, já no eixo, houve aumento contínuo de proteínas, mas o conteúdo de lipídios permaneceu praticamente inalterado, reforçando a teoria da utilização dos lipídios, pelos glioxossomos, como fonte de cadeias carbônicas para a síntese de carboidratos.

É interessante salientar que a formação geológica do Estado do Ceará, associada às condições de clima e manejos de solo inadequados, podem propiciar processos de salinização e alcalinização do solo e, por conseguinte, prejudicar o cultivo do cajueiro (Almeida *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 1998). Ademais, as

condições que levam à salinização podem ser agravadas pelo processo de irrigação, exigência da moderna cajucultura, principalmente em função da qualidade da água utilizada e das altas taxas de evaporação da região.

1.8 Justificativa

Anacardium occidentale L. é a única espécie cultivada e a de maior dispersão do gênero *Anacardium*, sendo encontrada principalmente nas zonas costeiras da Região Nordeste (Barros, 1988). Com o lançamento do cajueiro-anão precoce, na década de 80, associado com a disponibilidade de mudas enxertadas de qualidade genéticas superior, o setor da cajucultura mostrou certa euforia, no sentido de ganhos de produtividade. Apesar das perspectivas favoráveis, a renovação das áreas com esses materiais ficou muito aquém das expectativas. Os atuais "clones" comerciais de cajueiro-anão precoce apresentam produtividade elevada e precocidade de produção quando comparados com o cajueiro comum do tipo gigante (Barros *et al.*, 2000). Por outro lado, a irrigação da cultura cria grandes perspectivas de recuperação e ganhos de rentabilidade desse setor agrícola na região semi-árida do Brasil. Em condições irrigadas, a produtividade da cultura pode aumentar até 20 vezes quando comparada com as condições de sequeiro (Cavalcanti Junior, 2001).

Grande parte dos solos do Nordeste do Brasil, principalmente das regiões semi-áridas, apresenta tendência a ser afetada por excesso de sais solúveis. Esses sais são provenientes, principalmente, da água de irrigação ou das águas de lençol freático elevado. O rendimento das culturas diminui quando os teores de sais na solução do solo são tais, que não permitem que a planta retire água suficiente da zona radicular, provocando assim, estado de escassez de água por tempo significativo (Ayers e Westcot, 1991).

As pesquisas têm evidenciado que o estresse salino em plantas jovens de cajueiro induz alterações bioquímicas e fisiológicas drásticas, especialmente nos conteúdos de Ca^{++} e K^+ nas raízes e que essa espécie é capaz de acumular grandes quantidades de prolina nas folhas (Silveira *et al.*, 2000). A continuidade dessas pesquisas requer a disponibilidade de genótipos com tolerância diferenciada para que sejam desenvolvidos estudos de fisiologia comparada, com intuito de definir características bioquímicas e fisiológicas que possam estar diretamente associadas

com a tolerância à salinidade. No cajueiro, não se conhecem moléculas marcadoras relacionadas à tolerância a estresses abióticos, como a salinidade.

Trabalhos sobre os efeitos da salinidade na produção da cultura de cajueiro bem como as respostas do cajueiro ao estresse salino, sobretudo no período de germinação e estabelecimento das plântulas, são pouco encontrados na literatura. Cavalcanti Júnior (1994) descreveu a mobilização de reserva em plântulas de cajueiro, cultivar CCP 76, durante seu estabelecimento. Pronunciada mobilização de lipídeos e proteínas foi verificada durante os primeiros dias após a germinação. Já Almeida (2003) descreveu um retardo da mobilização de reservas cotiledonares em plântulas de cajueiro expostas ao estresse salino durante seu estabelecimento tardio.

O excesso de sais pode retardar a germinação por diminuição na atividade de enzimas envolvidas com a hidrólise das substâncias de reservas. Na comparação entre as amilases, lipases e proteases, a literatura mostra que as primeiras são as enzimas mais estudadas em relação ao estresse salino e deficiência hídrica. Existe a necessidade de um estudo das enzimas proteolíticas do cajueiro, relacionadas à mobilização das reservas, sob condições salinas com finalidade de compreender melhor como o NaCl pode retardar o desenvolvimento da planta.

Os mecanismos induzidos pela salinidade sobre os processos bioquímicos e fisiológicos do caju são pouco estudados principalmente durante germinação e o estabelecimento de plântulas. O conhecimento a respeito de quais produtos protéicos das reservas cotiledonares possuem sua mobilização mais limitada pelo estresse salino, e suas conseqüências no crescimento inicial das diferentes partes da plântula, poderá contribuir para uma melhor compreensão da fisiologia do estresse salino, assim como abrir perspectivas na seleção de genótipos mais tolerantes.

1.9 Hipótese Geral

O estresse salino retarda a germinação e o estabelecimento de plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) através do controle tipo fonte-dreno.

1.10 Objetivos

1.10.1 Geral

Avaliar mecanismos fisiológicos envolvidos com a mobilização de reservas cotiledonares durante a germinação e estabelecimento de plântulas de cajueiro, na presença e ausência de salinidade (NaCl).

1.10.2 Específicos

- Observar os efeitos do estresse salino analisando a partição de fitomassa, crescimento e desenvolvimento durante a germinação e estabelecimento de plântulas de cajueiro.
- Analisar o processo de mobilização de reservas cotiledonares durante a germinação e o estabelecimento de plântulas de cajueiro sob estresse salino.
- Estudar a mobilização das reservas protéicas durante a germinação e o estabelecimento de plântulas de cajueiro na presença de NaCl, e as enzimas envolvidas nesse processo.

1.11 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, F.A.J. O sucesso do cajueiro anão: clones de castanhas grandes e pesadas. **FRUTAL 2002 - Palestra Técnica**, Fortaleza, Ceará, set /2002.

ALMEIDA, F.C.G.; SILVA A.Z.; ALBUQUERQUE, J.J.L.; MENEZES JR, J. Ecologia comparativa da produtividade de duas progênies de cajueiro anão sob condições de irrigação. **Ver. Faculdade Agronomia Maracay**, Venezuela, v.24 (1), p.24 – 56, 1998.

ALMEIDA, F.C.G.; SILVA, A.Z.; ALBUQUERQUE, J.J.L.; MENEZES JR, J. Fenologia comparativa de duas progênies de cajueiro anão sob condições de irrigação. **Ver. Faculdade Agronomia Maracay**, Venezuela, v. 21, p.157-178, 1995.

ALMEIDA, T.D. Mobilização de reservas cotiledonares para folhas de plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino. **Monografia Apresentada na Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza. 2003.

- AL-NIEMI, T. S.; Campbell, W. F.; Rumbaugh, M. D. Response of alfafa cultivars to salinity during germination and post-germination growth. **Crop Science**, v.32, p.976-980, 1992.
- AMZALLAG, G. N. Tolerance to salinity: new concepts for old problems. In: **Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants**. Eds: JAIWAL, P. K., SINGH, R. P., GULATI, A. Oxford Publishing. p:1-24. 1997.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v.166, p.3-16, 2004.
- ASHRAF, M.; KHANUM, A. Relationship between ion accumulation and growth in two spring wheat lines differing in salt tolerance at different growth stages. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.178, p.39-51, 1997.
- ASHRAF, M.; ZAFAR, R.; ASHRAF, M. Y. Time-course changes in the inorganic and organic components of germinating sunflower achenes under salt (NaCl) stress. **Flora**, v.198, p.26-36, 2003.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água para irrigação**. Campina Grande: UFPB, 1991. 218p.
- AZAIZEH, H.; GUNSE, B.; STEUDLE, E. Effects of NaCl and CaCl₂ on water transport across root cell of maize (*Zea mays* L.) seedlings. **Plant Physiology**, v.99, p.886-894, 1992.
- AZEVEDO NETO, A. D. Aspectos fisiológicos e bioquímicos do estresse salino em plantas de milho. 2005. 149f. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- AZEVEDO NETO, A. D.; TABOSA, J. N. Estresse salino em plântulas de milho: II. Distribuição de macronutrientes catiônicos e suas relações com o sódio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, p.165-171, 2000.
- BARRETT, A.J. The classes of proteolytic enzymes. In: **Plant proteolytic enzymes**. Dalling, M.J. ed. Vol. 1, CRC Press Inc. Boca Raton, FL, USA. 1986.
- BARRETT, A.J. Classification of peptidases. In: **Methods Enzymol**. Vol. 244. Barrett, A.J. ed. Academic Press. San Diego, CA. USA. 1994.
- BARROS, L. M. Nutrição mineral e adubação. In: A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil (Lima, V. P.). **Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste**. Fortaleza, BNB, p.486, 1988.
- BARROS, L. M.; CAVALCANTI, J.J.; VASCONCELOS, J.; PAIVA, J.R. Seleção de clones de cajueiro-anão para o plantio comercial no Estado do Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.11, p.2197-2204, 2000.
- BARROS, L. M. Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tipos comum e anão-precoce, por meio de técnicas

- multivariadas. **Tese de Doutorado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, p.256, 1991.
- BAILEY, L.H. **The standard cyclopedia of horticulture**. New York : MacMillan, 1942. 1200p.
- BEWLEY, J. D. Seeds germination and reserve mobilization. In: Encyclopedia of life sciences. **Nature Publishing Group www.els.net**, 2001.
- BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell** v.3 p.1055-1066,1997.
- BEZERRA, M.A.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Crescimento e fotossíntese de plantas jovens de cajueiro anão precoce sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, (Suplemento), p.90-94, 2005.
- BOURSIER, P.; LÄUCHLI, A. Growth responses and mineral nutrient relations of salt-stressed sorghum. **Crop Science**, v.30, p.1226-1233, 1990.
- BOYER, J. S. Effects of osmotic water stress on metabolic rates of cotton plants with open stomates. **Plant Physiology**, v.40, p.229-234, 1965.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v.2, p.48-54, 1997.
- BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A.; SANTOS, H.P.; LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12, p. 137-162, 2000.
- CARDOSO, B. B. Efeitos comparativos da salinidade sobre o metabolismo do nitrogênio em folhas e nódulos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] inoculado com *Bradyrhizobium* sp. 2000. 98 p. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
- CAVALCANTI JUNIOR, A.T. Morfo-fisiologia da germinação e estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce. **Tese de Doutorado**. Lavras - MG. p.84, 1994.
- CHAPMAN, V. J. The salinity problem in general, its importance and distribution with special reference to natural halophytes. IN: POLKAKOFF-MAYBER, A. & GALE, J. (Eds). **Plants in saline environments**. New York: Heildeberg, Berlin: Springer-Verlag, p.7-24, 1975.
- CHEESEMAN, J. M. Machanisms of salinity tolerance in plants. **Plant Physiology**. v.87, p.547-550, 1988.
- CHEN, C. C. S.; PLANT, A. L. Salt-induced protein synthesis in tomato roots: the role of ABA. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.334, p.677-687, 1999.

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

COCUCCI, A.E.; MARIATH, J. E. A.; PARTE 1. Formação do Diásporo: gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e o diásporo maduro. In: Alfredo Gui Ferreira; Fabian Borguetti. (Org.). **Germinação: Do Básico Ao Aplicado**. v.1 Porto Alegre, 2004.

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

CRISÓSTOMO, L.A.; SANTOS, F.J.S.; OLIVEIRA V.H.; VAN RAIJ, B.; BERNARDI, A.C.C.; SILVA, C.A.; SOARES, I. Cultivo de Cajueiro Anão-Precoce: aspectos fitotécnicos com ênfase na adubação e na irrigação. **Fortaleza: Agroindústria Tropical**, (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnica 8), p.1-9, 2001,

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

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

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

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

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

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/ Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical. Descoberto substituto para a goma arábica. **Agroindústria Tropical**. Fortaleza. v. 1, p. 2-3, 1994.

FAGERIA, N.K.; GHEYI, H.R. Melhoramento Genético das culturas e seleção de cultivares. **Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura Irrigada**. UFPB/SBEA. Campina Grande, PB, 1997.

FIEC- Federação das Industrias do Estado do Ceará- exportação cearense no período 2001/2002. disponível em <<http://www.sfirc.org.br/>>

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

- GIORGINI, J. F. E CAMPOS, C. A. S. P. Changes in the content of soluble sugars and starch synthesis and degradation during germination and seedling growth of *Coffea arabica* L.. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, p. 11-15, 1992.
- GORHAM, J.; WYNJONES, T. G.; McDONNELL, E. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. **Plant Soil**, v.89, p.15-40, 1985.
- GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual review of Plant Physiology**, v.30, p.149-155, 1980.
- GREGORIO, G. B.; SENADHIRA, D.; MENDOZA, R. D.; MANIGBAS, N. L.; ROXAS, J. P.; GUERTA, C. Q. Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. **Field Crops Research**, v.76, p.91-101, 2002.
- GULZAR, S.; KHAN, M. A. Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus lagopoides*. **Annals of Botany**, v.87, p.319-324, 2001.
- HAMPSON, C. R.; SIMPSON, G. M. Effects of temperature, salt, and osmotic potential on early growth of wheat (*Triticum aestivum*). I. Germination. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.524-528, 1989.
- HUANG, J.; REDMANN, R. E. Salt tolerance of *Hordeum* and *Brassica* species during germination and early seedling growth. **Canadian Journal of Plant Science**, v.75, p.815-819, 1995.
- HUANG, L., MURRAY, F., YANG, X. Interaction between mild NaCl salinity and sublethal SO₂ pollution on wheat *Triticum aestivum* cultivar "Wilfonyne" (Ciano/Gallo) I. Responses of stomatal conductance, photosynthesis, growth and assimilation partitioning. **Agricultural Ecosystem Environmental**, v.48, p.163-178, 1994.
- HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Effect of salt stress on germin gene expression in barley roots. **Plant Physiology**, v.110, p.971-977, 1996.
- JAFARI-SHABESTARI, J.; CORKE, H.; QUALSET, C. O. Field evaluation of tolerance to salinity stress in Iranian hexaploid wheat landrace accessions. **Genetic Resources and Crop Evaluation**, v.42, p.147-156, 1995.
- JAMES, R. A.; RIVELLI, A. R.; MUNNS, R.; VON CAEMMERER, S. Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt stressed durum wheat. **Functional Plant Biology**, v.29, p.1393-1403, 2002.
- BRILHANTE, J.C.A. ;SILVEIRA, J.A.G.; ROCHA, I.M.A; MORAIS, D.E. & VIÉGAS. R. A. Influência do tempo de aclimação na resposta do cajueiro à salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental Engenharia**. v.10, n.4, p.xxx-xxx, 2006.
- JOHNSON, D.V. O caju do Nordeste do Brasil: um estudo geográfico. **Fortaleza: ETENE/BNB**. p.169, 1974.

- JOSHI, A. J.; MALI, B. S.; HINGLAJIA, H. Salt tolerance at germination and early growth of two forage grasses growing in marshy habitats. **Environmental and Experimental Botany**, v.54, p.267-274, 2005.
- KATEMBE, W. J.; UNGAR, I. A.; MITCHELL, J. P. Effect of salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae). **Annals of Botany**, v.82, p.167-175, 1998.
- KHAN, M. A.; UNGAR, I. A. The effect of salinity and temperature on the germination of polymorphic seeds and growth of *Atriplex triangularis* Willd. **American Journal of Botany**, v.71, n.4, p.481-489, 1984.
- KOORNNEEF M.; BENTSINK L. E HILHORST H. Seed dormancy and germination. **Current Opinion in Plant Biology** v. 5, p.33-36, 2002.
- LACERDA, C. F. Efeitos da salinidade no desenvolvimento e composição mineral do feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e utilização do Ca²⁺ como meio para minorar tais efeitos. 1995. 87 f. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.
- LAROSA, P. C.; RHODES, D.; RHODES, J. C.; BRESSAN, R. A.; CSONKA, L. N. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered d¹-pyrroline-5-carboxylate reductase. **Plant Physiology**, v.96, p.245-250, 1991.
- LAUTER, D. J.; MEIRI, A., SHUALI, M. Isoosmotic regulation of cotton and peanut at saline concentration of K and Na. **Plant Physiology**, v.87, p.911-916, 1988.
- LI, W.; LIU, X.; KHAN, M. A.; Yamaguchi, S. The effect of plant growth regulators, nitric oxide, nitrate, nitrite and light on the germination of dimorphic seeds of *Suaeda salsa* under saline stress. **Journal of Plant Research**, v.118, p.207-214, 2005.
- LIMA, V.P.M.S. Botânica. In: LIMA, V.P.M.S. A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil. **Fortaleza: BNB/ETENE, Estudos Econômicos e Sociais**, v.35 p.15-61, 1988.
- LIU, J.; ZHU, J. K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.114, p.591-596, 1997.
- LOW, P. S. Molecular basis of the biological compatibility of nature osmolytes. In: Transport process, Iono and osmoregulation. GILLES, R.; GILLES-BAILLIEN, M. (eds). Berlin: **Springer-verlag**, p.469-477, 1985.
- LYNCH, J.; LAUCHLI, A. Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L.). **New Phytologist**, v.99, p.345-354, 1985.
- MAAS, E. V. Salinity and citriculture. **Tree Physiology**, v.12. p.195-216, 1993..

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

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

MELO, J.R.V. Maturação, germinação e armazenamento de sementes de piaçaveira (*Attalea funifera Mart.* **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual Paulista. Botucatu. p.115, 2001.

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

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

MITCHELL, J.D.; MORI, S.A. The cashew and its relatives (Anacardium: anacardiaceae). **Memories On The New York Botanical Garden**. v.42, p.1-76, 1987.

MOTA, M.O. Cajueiro nordestino. **Fundação de Cultura Cidade do Recife**. 3

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

MORAIS, D.L.; VIÉGAS, R. A.; SILVA, L.M.M.; JUNIOR, A. R. L.; COSTA, R.C.L.; ROCHA, I.M.A.; SILVEIRA, J.A.G. Acumulação de íons e metabolismo de N em cajueiro anão em meio salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.10, n.4, p.xxx–xxx, 2006.

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

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

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

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

MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; Tiedemann, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**. vol. 52(362), p. 1742-1752, 2001.

MÜNTZ, K.; SCHLERETH, A.; BECKER, C.; HORSTMANN, C.; TIEDEMANN, J.; Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa*). **Journal of Experimental Botany**, v. 51(359), p. 1423-1433, 2001.

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

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

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

OLIVEIRA, V.H.; ANDRADE, A.P.S. Produção Integrada de Caju – abrindo portas para a qualidade. Fortaleza, 2005. Disponível em <http://www.embrapa.br>. Acesso em 23 de março de 2005.

PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTOS, M. C.; MCCARTHY I. E DEL RÍO, L.A. Plant protease, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p.521-530, 2002.

PAIVA, J.R.; BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R.; ARAÚJO, J.P.P.; ROSSETTI, A.G.; CAVALCANTE, J.J.V.; FELIPE, E.M. Depressão por endogamia em progênies de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) var. nanum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.4, p.425-431. 1998.

PARENTE, J.I.G.; PAULA PESSOA, P. F. A. de; NAMERATA, Y. **Diretrizes para a recuperação da cajucultura do Nordeste**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, (Documentos, 04) 38p. 1991.

PENG, J E HARBERD, N.P. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. **Current Opinion Plant Biology**, v. 5, p. 376-81, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RUSSELL, L.; LARNER, V.; KURUP, S.; BOUGOURD S.E HOLDSWORTH, M. J. The Arabidopsis COMATOSE locus regulates germination potential: **Development**. V.127, p. 3759-3767, 2000.

RYAN, C.A. AND WALKER-SIMMONS, M. Plant proteinases. In: Marcus, A. ed. **The Biochemistry of Plants**. Academic Press Inc. Vol. 6, 1981.

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

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

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

SHEWRY, P.R. E CASEY, R. **Seed proteins**. Dordrecht: Kluwer Press, p.883 ISBN 0412815702.

SILVEIRA, J.A.G.; VIÉGAS, R.A.; E QUEIROZ J.E. Alterações no metabolismo do nitrogênio e acumulação de prolina em plantas jovens de cajueiro submetidas ao estresse salino. **Livro de Resumos XVI Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Fortaleza-Ceará, p. 251, 2000.

SILVEIRA J.A.G.; VIÉGAS R.A.; ROCHA, I.M.A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.M.; OLIVEIRA J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, Rockville, v.160, n.2, p.115-123, 2003.

SOARES, J.B. O caju: aspectos tecnológicos. Fortaleza. **BNB**. p.56, 1986.

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

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

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

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

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

TELLES, P.R.S. Industrialização do pseudofruto e da castanha. In: Banco do Nordeste. A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil. Fortaleza. **Banco do Nordeste**. p.357-401, 1988.

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

TSAI, Y.-C.; HONG, C.-Y.; LIU, L.-F.; KAO, C. H. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H₂O₂. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.291-299, 2005.

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

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

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

VIÉGAS, R. A.; Melo, A. R. B.; Silveira, J. A. G. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew (*Anacardium occidentale* L.) in response to salt (NaCl) shock. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v.11. p. 21 –28, 1999.

VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Ammonia assimilation and proline accumulation in Young cashew plants during long-term exposure to NaCl-salinity. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**. v. 11(3), p.131-134, 1999.

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

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

WINICOV, I. New Molecular Approaches to Improving Salt tolerance in Crop Plants. **Annals of Botany**. V.82, p. 703-710, 1998.

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

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

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

YEO, A.R., YEO, M.E., FLOWERS, S.A., FLOWERS, T.J. Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance,

and their relationship to overall performance. **Theoretical and Applied Genetics**, v.79, p.377–384, 1990.

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

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

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

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

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

Partição de fitomassa durante a germinação e estabelecimento das plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) sob salinidade com NaCl

CAPÍTULO 2

2. 1 Introdução

O cajueiro é uma cultura com grandes perspectivas econômicas pela aceitação da amêndoa, obtida do fruto, no mercado internacional, razão de participar de forma expressiva na sócio economia do Nordeste brasileiro. Dentre os resultados de pesquisa com essa espécie, na região, destaca-se a criação de novas variedades mais produtivas, como o cajueiro-anão precoce, com índices de produtividade bem superiores aos dos genótipos tradicionais (Bezerra, *et al.*, 2002).

O cajueiro-anão tem características de produção precoce, inicia o ciclo produtivo econômico a partir do segundo ou terceiro ano após plantio e atinge estabilidade produtiva aos cinco anos, podendo ser cultivado tanto em áreas irrigadas quanto sob condições de sequeiro. Tem ocorrido, também, aperfeiçoamento das técnicas de propagação, envolvendo preparação de substratos e acondicionamento de mudas, permitindo a obtenção de plantas mais vigorosas, por melhorar a eficiência da nutrição e baixar os custos de produção, por economia de espaço, água e de substrato (Silva & Silva, 1999).

No Nordeste do Brasil, são aproximadamente nove milhões de hectares de terra plantada, envolvendo sete Estados. Na Bahia encontra-se a maior área de solos afetados por sais, cerca de 44 % da área salinizada, seguida pelo Ceará, com aproximadamente 25,5% (Fageria & Gheyi, 1997). Existe grande variabilidade de comportamento entre as culturas com relação aos limites de tolerância à salinidade. Genótipos de uma mesma espécie podem responder de modo diferente aos efeitos salinos, nas várias fases de seu desenvolvimento (Maas & Hoffmann, 1977; Maas, 1986). Todavia, a maioria das espécies cultivadas de importância econômica é relativamente sensível à salinidade na germinação e quase todas as culturas não toleram condições permanentes de salinidade no solo (Kramer, 1984).

O estresse salino inibe ou retarda a germinação das sementes e o crescimento das plântulas devido a efeitos osmóticos e/ou iônicos. O primeiro distúrbio fisiológico causado pelo estresse salino é a restrição da captação de água devido à diminuição do potencial osmótico do substrato, retardando a embebição das sementes ou o alongamento da raiz (Redmann, 1972; Wahid *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Ramoliya e Pandey, 2002; Ramoliya e Pandey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2005).

Distúrbios na organização das membranas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), produção de metabólitos tóxicos, inibição da fotossíntese e a diminuição na obtenção de nutrientes são as alterações iniciais mais drásticas causadas pelo estresse hiperosmótico (Winicov, 1998). Além disso, as altas concentrações de sais no solo causam também um estresse hiperiônico (excesso de íons tóxicos) e a consequência de ambos (estresse hiperosmótico e estresse hiperiônico) pode ser altamente danosa para a planta. O estresse iônico causa um desequilíbrio de íons não apenas de Na^+ e de Cl^- , mas também de K^+ e de Ca^+ (Zhu, 2001, Chen e Plant, 1999; Yeo, 1998).

Em relação ao cajueiro, os estudos existentes de salinidade abrangem apenas a fase de formação de plantas jovens e de porta-enxerto sem haver, entretanto, trabalhos relacionados à germinação e o estabelecimento de plântulas. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da salinidade (NaCl 50mM) na germinação de sementes e estabelecimento de plântulas do cajueiro-anão precoce, analisando o efeito osmótico e/ou iônico e a partição de fitomassa em diferentes órgãos (relação fonte-dreno).

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Descrição dos experimentos

O trabalho foi constituído de dois tipos de semeadura, denominados de semeadura I, conduzido sob condições de casa de vegetação e semeadura II, conduzido sob condições controladas na sala de crescimento. Paralelamente, foram realizadas análises químicas e bioquímicas dos tecidos cotiledonares e embrionários, além das pesagens necessárias para avaliar o fluxo de massa dos órgãos das plântulas.

2.2.2 Condições ambientais de semeadura

Castanhas de cajueiro, genótipo CCP 76, foram fornecidas pela EMBRAPA – CNPAT – CE. Nos experimentos de germinação, as castanhas foram desinfetadas por imersão em NaClO 0,2% (v/v) durante 10 min, seguida de três lavagens com água destilada. Logo após, as castanhas foram imersas em água

destilada, por um período de 24 horas para acelerar o processo de embebição. Após a embebição, as castanhas foram acondicionadas nos seus respectivos substratos e os vasos transferidos para casa de vegetação.

As castanhas foram semeadas em vermiculita contida em vasos de 400 mL, umedecida a 70% da capacidade de campo com água destilada (tratamento controle) ou NaCl 50 mM (tratamento salino).

A semeadura I foi desenvolvida na sala de crescimento, com condições controladas de umidade, luminosidade e temperatura. A umidade relativa do ar variou entre 40 a 80%, a luminosidade com fotoperíodo de 12 horas, a temperatura atingiu 25 ± 2 °C. A radiação fotossinteticamente máxima nas proximidades das folhas foi de aproximadamente $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mensurado com um “quantun sensor” acoplado a um porômetro (LI-1600 steady state porometer, Li-Cor, USA).

A semeadura II foi desenvolvida em casa de vegetação, com condições naturais de luminosidade do verão da cidade de Fortaleza-CE, a qual atingia o valor máximo às 12h00min horas e fotoperíodo com duração média de 12 horas. A temperatura média no interior da casa de vegetação foi sempre estabelecida nos intervalos entre 28 e 36 °C durante o dia e entre 24 e 27 °C durante a noite com umidade relativa do ar variando entre 40 e 80%. A radiação fotossinteticamente máxima nas proximidades das folhas foi de aproximadamente $1.000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mensurado com um “quantun sensor” acoplado a um porômetro (LI-1600 steady state porometer, Li-Cor, USA).

2.2.3.Obtenção dos cotilédones e das plântulas

2.2.3.1 Semeadura I: Efeito da salinidade (NaCl) sobre a mobilização do fluxo de massa durante germinação e o estabelecimento das plântulas coletadas nos mesmos tempo de semeadura.

Para obtenção das plântulas, coletadas no mesmo tempo de semeadura, as castanhas foram tratadas e plantadas nas mesmas condições descritas anteriormente (**item 2.2.2**). No entanto, os vasos foram mantidos em condições controladas na sala de crescimento da casa de vegetação por 30 dias. Os tempos escolhidos para coletas foram: *semente em processo de embebição – 4 e 8 dias após a semeadura (DAS) emissão da radícula – 12 DAS; emissão das folhas*

primárias (FP) – 16 DAS; expansão das FP – 20 DAS; FP totalmente expandidas – 24 DAS. Foram coletadas três plântulas (repetições) por estágio de desenvolvimento de cada tratamento.

Três cotilédones (um de cada repetição) foram utilizados para análises bioquímicas. Os outros três cotilédones (o segundo de cada repetição) foram pesados e colocados para secar na estufa a 60 °C por 48 horas para determinação do teor de água e, posteriormente, sódio e potássio. Os cotilédones separados para análises bioquímicas foram pesados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, sendo transferidos para freezer -80 °C para determinações posteriores.

2.2.3.2 Semeadura II: Efeito da salinidade (NaCl) sobre a mobilização do fluxo de massa durante germinação e o estabelecimento das plântulas coletadas nos mesmos estádios fisiológicos de desenvolvimento.

Para obtenção das plântulas coletadas no mesmo estágio fisiológicos de desenvolvimento, as castanhas foram tratadas e plantadas nas mesmas condições descritas anteriormente (item 2.2.2). No entanto, os vasos foram mantidos em condições de casa de vegetação por 26 dias. Os estádios escolhidos para coletas foram: **E1- emissão da radícula** – 10 dias após a sementeira (DAS); **E2- emissão das folhas primárias (FP)** – 14 DAS; **E3- expansão das FP** – 18 DAS; **E4- FP totalmente expandidas** – 22 DAS e **E5- expansão das folhas secundárias (FS)** – 26 DAS. Foram coletadas três plântulas (repetições) por tempo de cada tratamento.

As coletas das sementes da sementeira I foram realizadas com dois dias de diferença quando comparada com a da sementeira II devido às condições de germinação, pois em condições controlada o processo de germinação atrasa de dois a três dias em relação às condições não controladas.

Três cotilédones (um de cada repetição) foram utilizados para análises bioquímicas. Os outros três cotilédones (o segundo de cada repetição) foram pesados e colocados para secar na estufa a 60 °C por 48 horas para determinação teor de água e, posteriormente, sódio e potássio. Os cotilédones separados para análises bioquímicas foram pesados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, sendo transferidos para freezer -80 °C para determinações posteriores.

2.2.4 Determinação da concentração de sódio e potássio

As concentrações de sódio e potássio foram determinadas por fotometria de chama conforme descrito em Silveira *et al.* (2000). Após secagem em estufa a 60 °C por 48 horas, 50 mg de amostras de cotilédones (farinha) foram incubados em banho-maria a 100 °C por 1 hora, em tubos hermeticamente fechados contendo 20 mL de água deionizada. Em seguida, o extrato foi filtrado e os teores de sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama utilizando-se fotômetro de chama do tipo Micronal B426a, calibrado com soluções padrões de sódio e potássio. As concentrações foram expressas em mmol.Kg⁻¹ de massa seca com bases em fatores obtidos através de equação das curvas a partir de soluções padrões de NaCl e KCl.

2.2.5 Percentagem de germinação das sementes

A germinação das sementes foi realizada com vermiculita em recipientes plásticos e individualmente. A percentagem de germinação foi determinada através das anotações realizadas do número de sementes com radícula emergida ao longo do tempo sob condições controladas (sala de germinação).

A fórmula utilizada para analisar esse índice foi:

$$G(\%) = (N/A) \times 100, \text{ onde:}$$

N = números de sementes germinadas

A = número total de sementes semeada

2.2.6 Índice de velocidade de emergência das sementes

O índice de velocidade de emergência (IVE) foi determinado através das anotações realizadas do número acumulado de sementes com epicótilo emergido ao longo do tempo sob condições controladas (sala de germinação).

IVE = Σn , número acumulado de sementes com epicótilos emergidos no dia.

2.2.7 Teor de água dos cotilédones

A massa fresca e massa seca foram registradas na balança digital após a coleta e secagem respectivamente, para determinar a porcentagem de água do tecido cotiledonar através da fórmula a seguir:

$$MS (\%) = (MS/MF) \times 100, \text{ em seguida, } U(\%) = 100 - [MS(\%)]$$

Onde: **MS** = massa seca; **MF** = massa fresca e **U** = umidade

2.2.8 Delineamento estatístico

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (controle e salino) e três repetições, sendo cada repetição representada por uma plântula. Os resultados foram comparados com base na análise das tendências das médias acrescidas dos respectivos desvios padrões. Somente as sementes com massa acima de 8 gramas e aparentemente saudáveis foram usadas para semeadura.

2.3 Resultados

2.3.1 Germinação e estabelecimento de plântulas em sala de crescimento (condições controladas)

As plântulas sob os dois tratamentos foram coletas ao mesmo tempo, onde uma nítida diferença de desenvolvimento, imposta pelo sal, foi observada. Sementes germinadas e plântulas de cajueiro foram coletadas com 12, 16, 20 e 24 dias após a semeadura sob tratamento controle e salino (50 mM) em condições controladas (figura 1).

A porcentagem de germinação das sementes sob salinidade foi inferior até o 14° dia comparada com as sementes com água destilada. A partir do 14° dia a diferença da porcentagem de sementes germinadas nos dois tratamentos diminuiu, estabilizando com uma diferença de apenas 5% (figura 2 a). Existe uma diferença marcante no índice de velocidade de emergência das sementes nos dois tratamentos, onde no 24° dia ainda é observado 22% de diferença do tratamento controle comparado com tratamento salino (figura 2 b), a porcentagem de

germinação máxima ficou próxima de 70 % para os dois tratamentos no 18°. Durante toda germinação e estabelecimento de plântulas o teor de água do tratamento controle dos cotilédones permaneceu maior, podendo chegar até 20% de diferença quando comparado com o tratamento salino, igualando somente na última coleta (figura 3 b).

Para verificação do estatus de água das sementes durante a germinação uma curva de embebição foi realizada. Durante os cinco primeiros dias de embebição não foi observada nenhuma diferença de água embebida pelas sementes nos dois tratamentos (figura 3 a). Após o quinto dia, a quantidade de água absorvida pelas sementes do tratamento salino passou a ser menor quando comparado com a quantidade de água absorvida do tratamento controle, portanto sendo observado um atraso da absorção de água responsável pelas sementes do tratamento controle germinarem primeiro que as do tratamento salino (figura 2 a).

Ainda sobre os cotilédones é visível o contraste entre os tratamentos controle e salino da massa fresca e massa seca de sementes de cajueiro semeadas sob condições controladas. Até o 12° dia ocorreu um aumento de massa fresca nos dois tratamentos, sendo o tratamento controle com maior conteúdo de massa fresca quando comparado com o tratamento salino, posteriormente houve um declínio quase que linear dos mesmos, sendo observado dessa vez um atraso da mobilização do conteúdo de massa fresca no tratamento salino (figura 4 a). Já nos primeiros 12 dias, não foi observada diferença de massa seca dos cotilédones entre os tratamentos, quando novamente ocorreu um declínio linear com atraso da mobilização do conteúdo de massa seca do tratamento estresse quando comparado com o controle (figura 4 b).

O conteúdo de sódio nos cotilédones sob tratamento salino praticamente dobrou no último tempo de coleta, e no tratamento controle ocorreu uma diminuição contínua tanto de sódio como de potássio, acompanhando a mobilização natural das reservas cotiledonares (figura 5 a, b) Também ocorreu uma diminuição do conteúdo de potássio nos cotilédones sob tratamento salino, mas a partir do 12° é observado um atraso evidente comparado com o conteúdo de potássio do tratamento controle (figura 5 b).



Figura 1. Plântulas coletadas no mesmo tempo de semeadura (a) sob tratamento controle (C) e tratamento salino (50 mM).

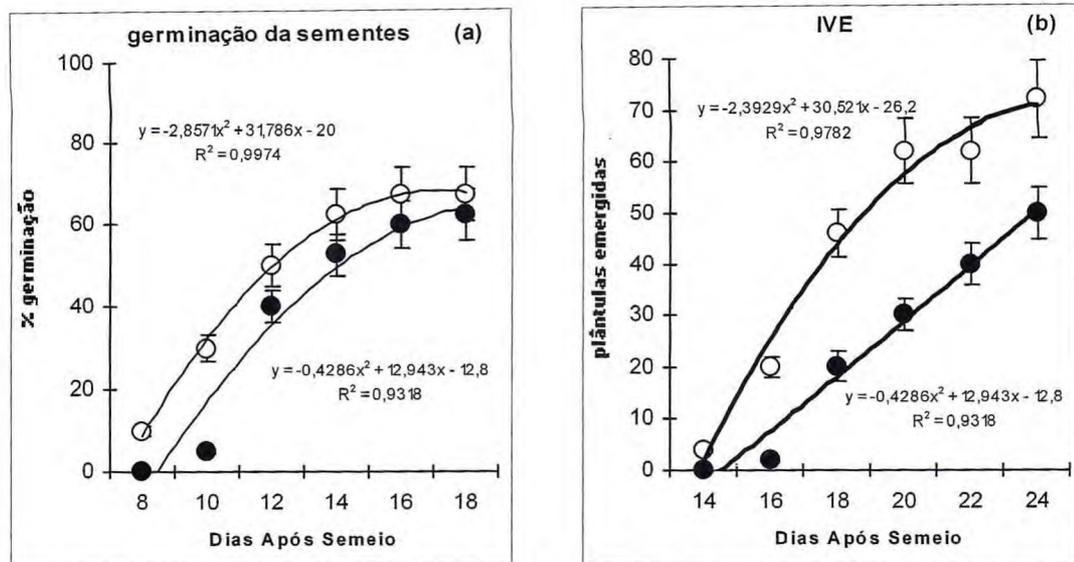


Figura 2. Percentagem de germinação (a) e índice de velocidade de emergência (b) das sementes de cajueiro semeadas na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50 mM.

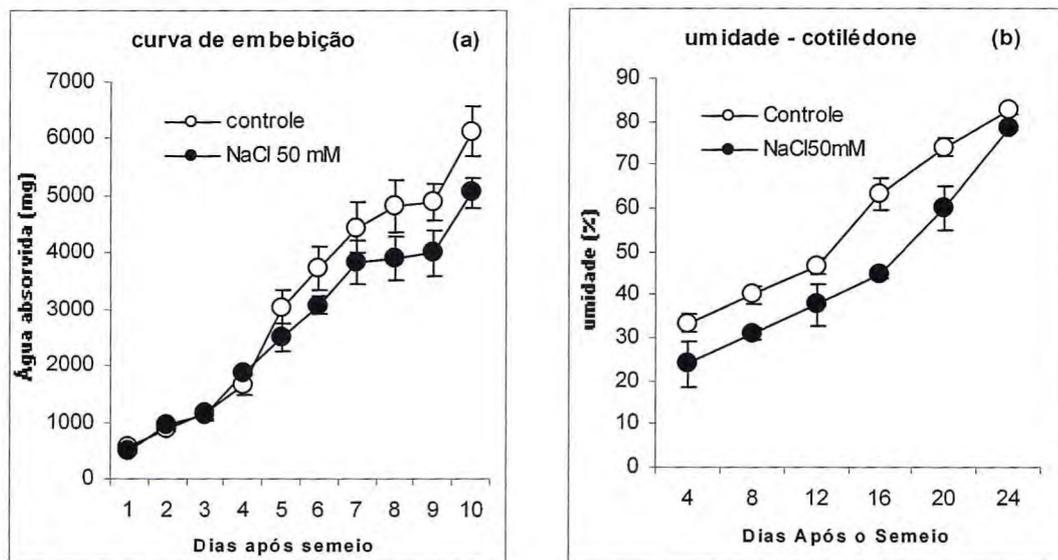


Figura 3. Curva de embebição (a) das sementes e umidade (b) dos cotilédones de cajueiro semeadas na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50 mM

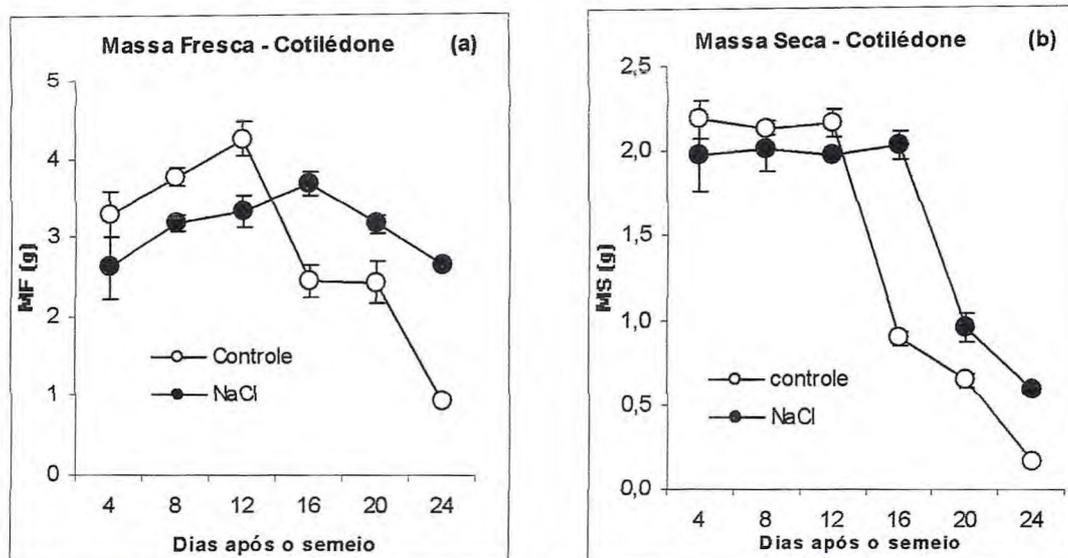


Figura 4. Massa fresca (a) e massa seca (b) dos cotilédones de cajueiro, cultivadas durante 24 dias após a sementeira, na presença (●) e na ausência (○) NaCl 50mM.

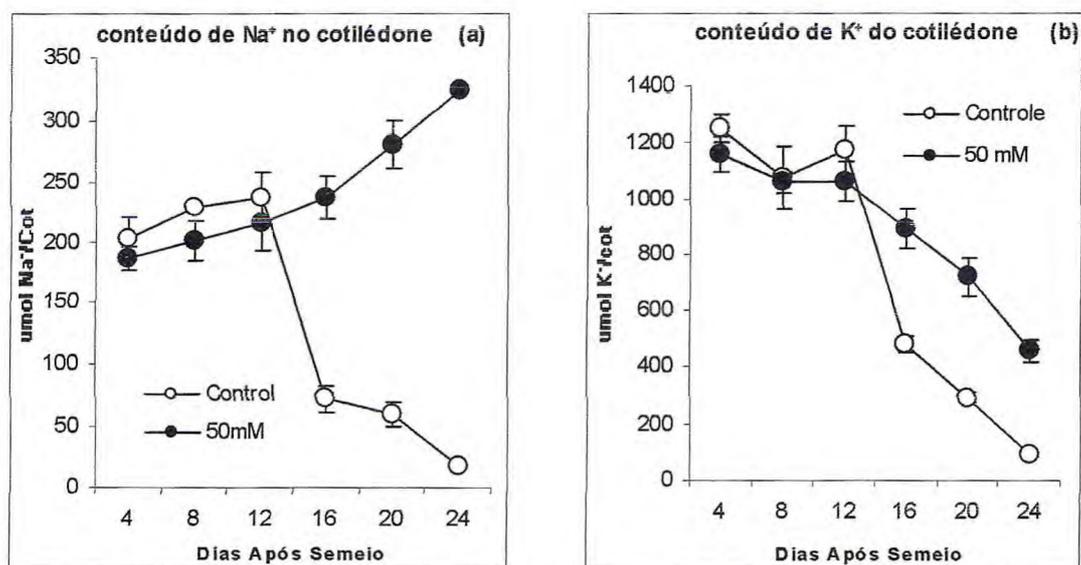


Figura 5. Conteúdo de sódio (a) e potássio (b) em cotilédones de cajueiro, cultivadas durante 24 dias após a sementeira, na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50mM.

Analisando o conteúdo de massa seca das partes aéreas e radiculares de plântulas de cajueiro, observa-se grande diferença nos dois tratamentos, sendo o tratamento controle com maior massa seca quando comparada com o tratamento salino. É interessante destacar que a massa seca das partes aéreas em ambos os tratamentos é o dobro da massa seca das partes radiculares (figura 6).

Na figura 7 é possível avaliar a porcentagem de biomassa seca das partes das plântulas durante tempos diferentes de coletas após a semeadura (16, 20 e 24 dias). Inicialmente a maior porcentagem de massa seca se encontra nos cotilédones para os dois tratamentos (74,36% no controle e 95,42% no salino), e na última coleta a maior porcentagem passa a ser da parte aérea (61,69% no controle e 46,9% no salino). É possível observar um atraso de quatro dias quando se compara as massas secas dos cotilédones em relação aos tratamentos, onde na coleta aos 20 dias controle é praticamente igual ao da coleta aos 24 dias do tratamento salino.

Novamente a concentração de sódio e potássio foi analisada mas, dessa vez, nos tecidos das partes aéreas e radiculares das plântulas de cajueiro. A concentração de sódio em ambas as partes das plântulas sob tratamento salino foram consideravelmente alta quando comparada com o tratamento controle que permaneceu constante durante todo o tempo de semeadura, cerca $100 \text{ umolNa}^+\text{gMS}^{-1}$. A concentração da Na^+ a partir do 12º dia aumenta quase que linearmente durante a semeadura chegando a $350 \text{ umolNa}^+\text{gMS}^{-1}$ na última coleta; nas raízes inicia com a concentração alta, em torno de $500 \text{ umolNa}^+\text{gMS}^{-1}$, e aumentando no decorrer do tempo (figura 8 A e C). A concentração de potássio nas partes aéreas e radiculares das plântulas decai com o passar do tempo, tanto no tratamento salino como no tratamento controle, sendo que nas partes aéreas ocorre um atraso do decaimento do tratamento salino quando comparado com o tratamento controle (figura 8 B e D).

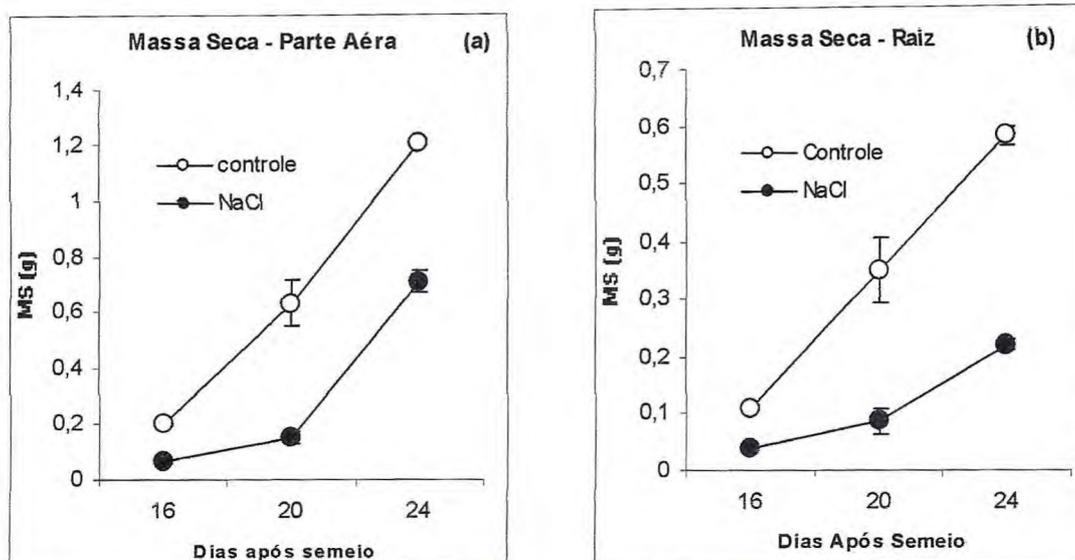


Figura 6. Massa seca da parte aérea (a) e raiz (b) de plântulas de cajueiro, cultivadas durante 24 dias após a sementeira, na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50 mM.

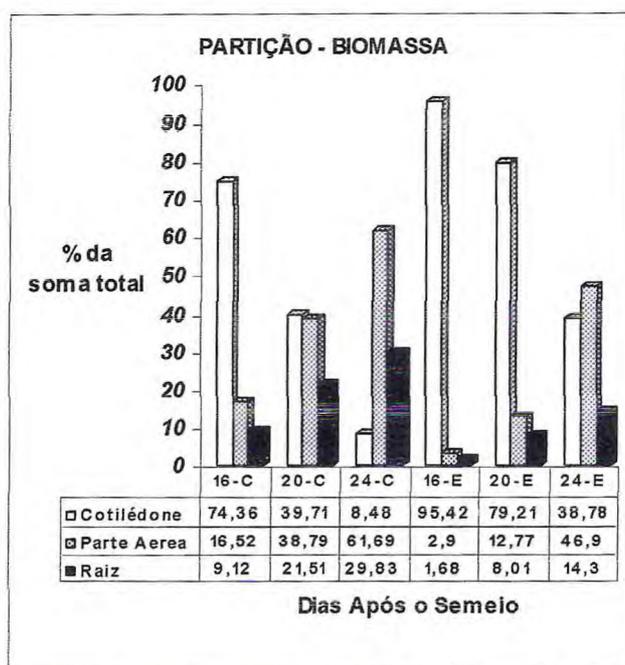


Figura 7. Partição da biomassa seca nos diferentes órgãos de plântulas de cajueiro, cultivadas durante 24 dias na presença (●) e na ausência (○) de NaCl 50 mM.

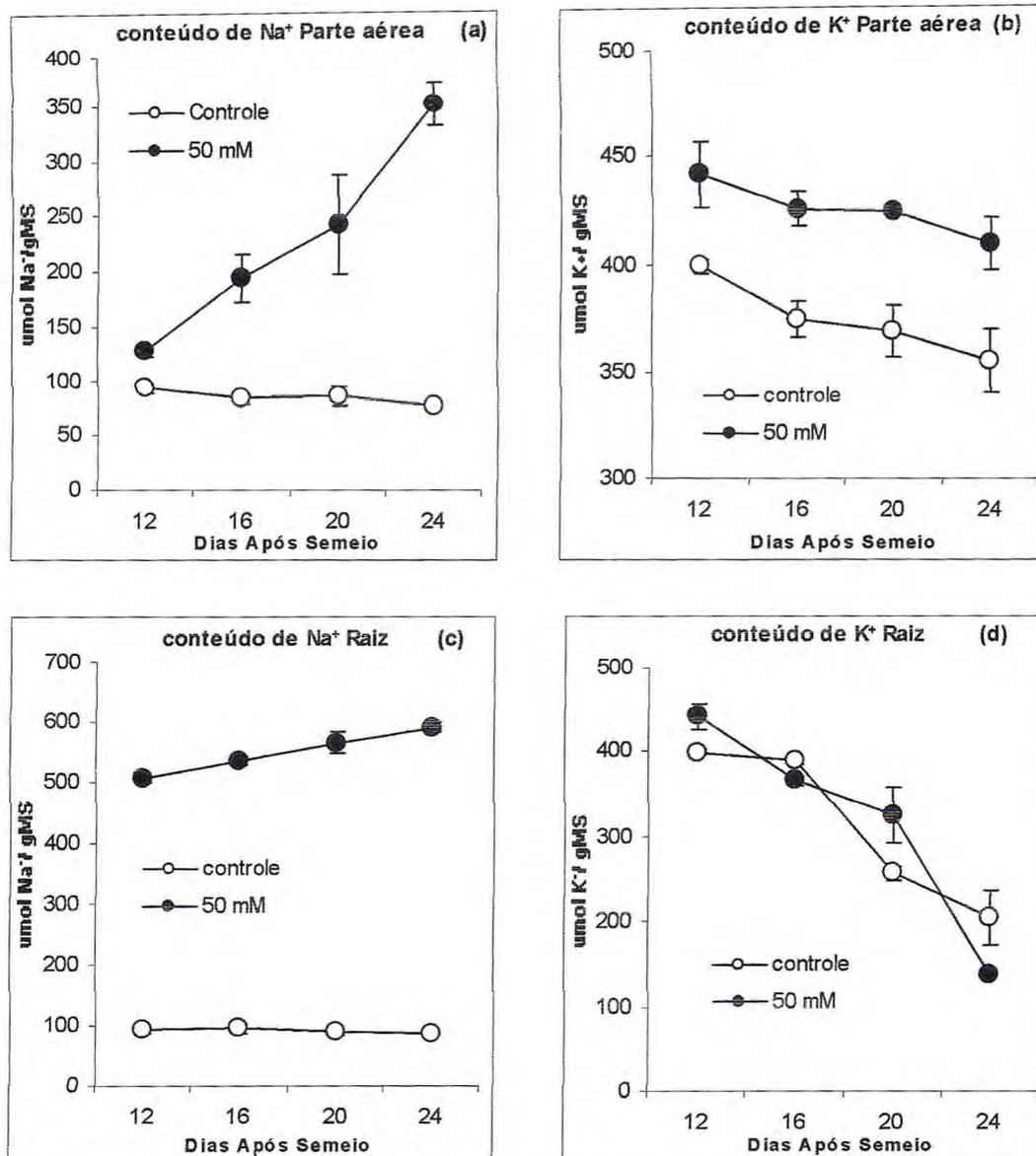


Figura 8. Conteúdo de sódio e potássio na parte aérea (a,b) e raiz (c,d) em plântulas de cajueiro, cultivadas durante 24 dias após a semeadura, na presença (●) e na ausência (○) de 50 mM de NaCl.

2.3.2 Germinação e estabelecimento de plântulas em casa de vegetação (condições não controladas)

Sementes germinadas e plântulas de cajueiro coletadas no mesmo estágio desenvolvimento (E1, E2, E3, E4 e E5) sob tratamento controle e salino (50 mM) em condições não controladas (figura 9). Notar que os estágios de desenvolvimento são semelhantes, onde as coletas das plântulas sob tratamento salino foram realizadas com três dias de atraso em relação ao tratamento controle. Plântulas de cajueiro submetida ao tratamento com 100 mM de NaCl foram comparadas com plântulas sob o tratamento controle e 50 mM (figura 9 E5).

Durante os quatro primeiros estágios a massa fresca permaneceu praticamente constante, sendo que no tratamento controle ocorreu um pequeno aumento, do E1 até E3, de aproximadamente 0,3g. Em seguida a massa fresca dos dois tratamentos diminuiu, sendo a do controle com mais intensidade (figura 10 A). A massa seca dos cotilédones nos tratamentos controle e salino diminuíram na mesma intensidade, atingindo 20 % da massa inicial no estágio 5 (figura 10 B). Durante todos os estágios de coletas dos cotilédones o teor de água do tratamento controle permanece maior, podendo chegar até 15 % de diferença quando comparado com o tratamento salino (figura 10 C).

A massa fresca das partes aéreas e raiz das plântulas no tratamento salino dos primeiros estágios (E1 e E2) é menor comparada com o controle, mas a partir do E2 ocorreu um aumento de massa no tratamento salino chegando a ultrapassar a massa fresca do tratamento controle (figura 11 A e C); já a massa seca nos dois tratamentos também aumentou com o passar do tempo, sendo a massa seca do salino sempre atrasada comparada com o controle, observando-se no último estágio uma maior diferença de massa entres os tratamentos avaliados (figura 11 B e D).

O teor de água na parte aérea e raiz passaram a ser contrastante nos últimos estágios (E3 e E4) entre os tratamentos, onde o salino retém mais água comparado com o controle (figura 12 A e B).

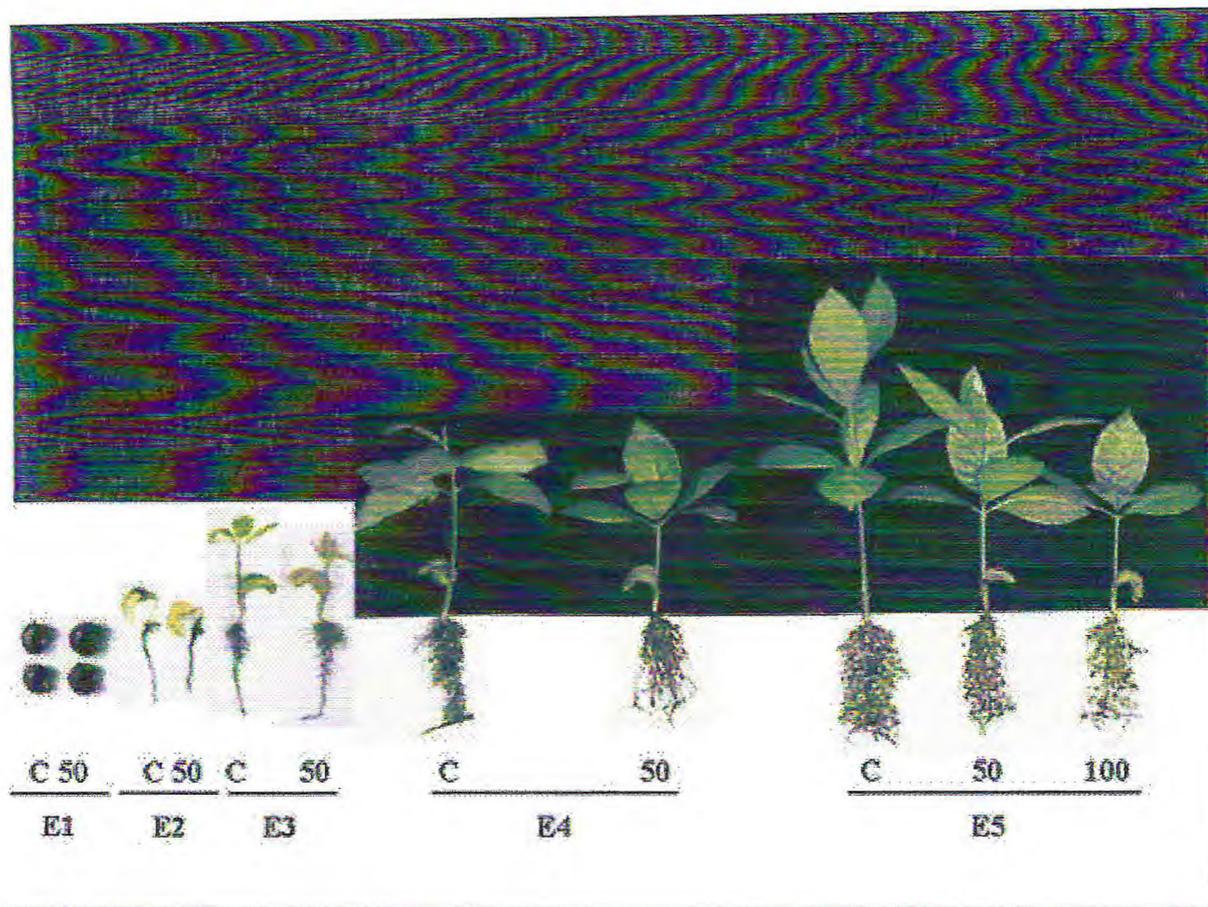


Figura 9. Plântulas coletadas no mesmo tempo de semeadura (a) sob tratamento controle (C) e tratamento salino (50 mM).

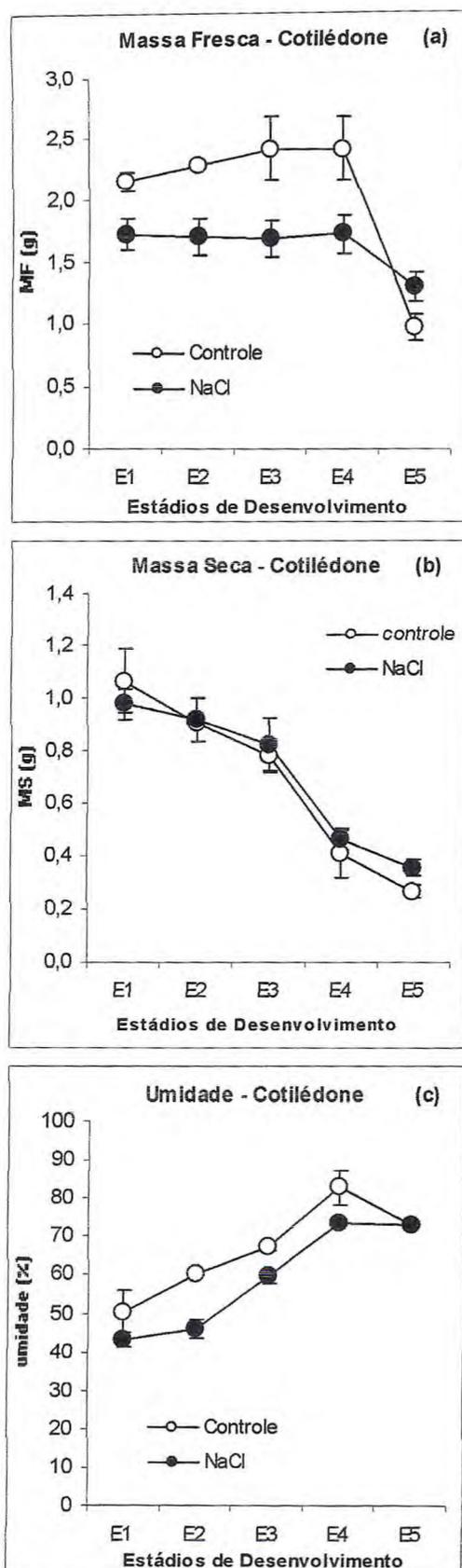


Figura 10. Massa fresca (a) massa seca (b) e teor de água relativa (c) dos cotilédones de plântulas de cajueiro no mesmo estágio de desenvolvimento fisiológico, na presença (●) e na ausência (○) de 50 mM de NaCl.

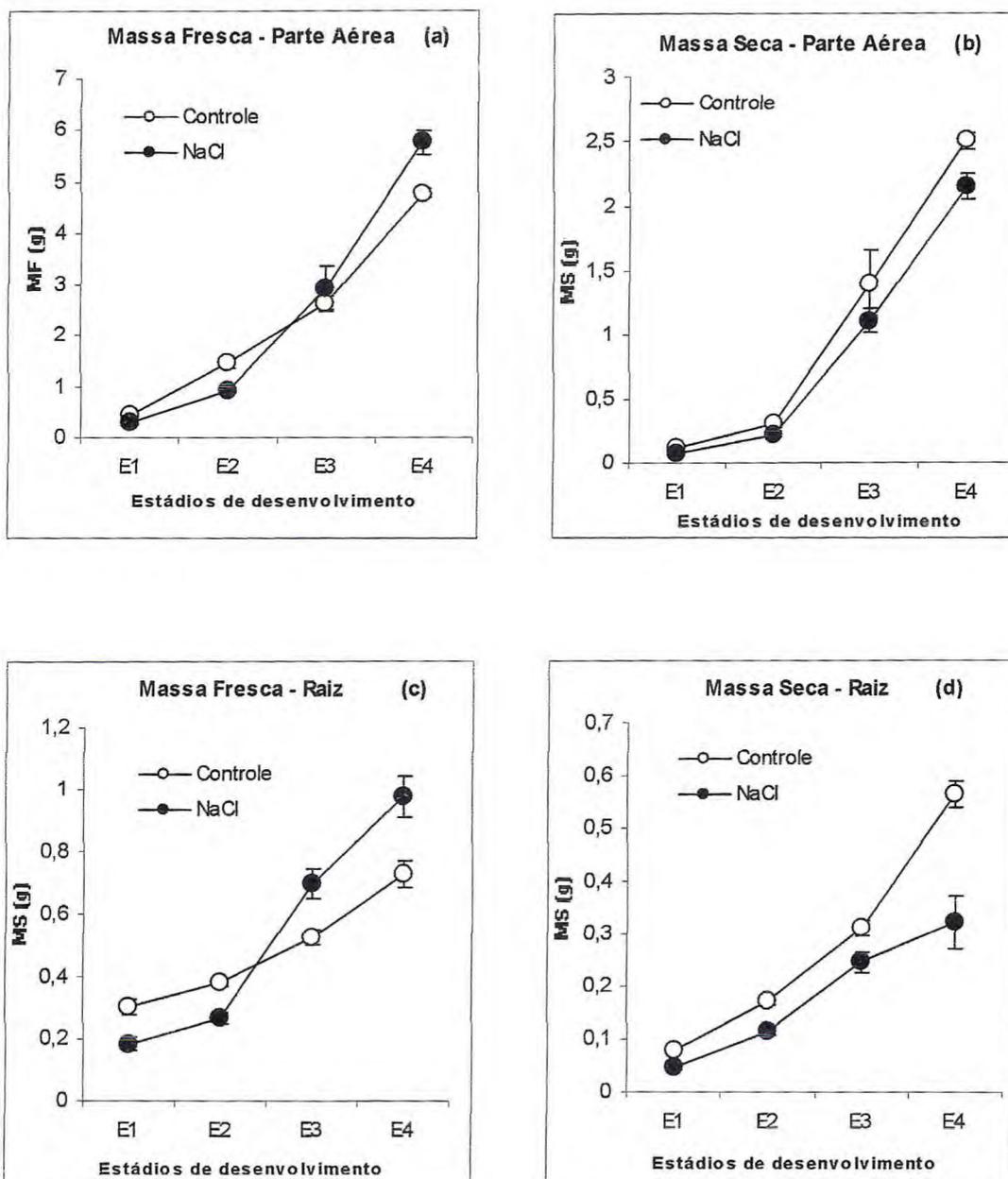


Figura 11. Massa fresca e massa seca da parte aérea (a,b) e raiz (c,d) de plântulas de cajueiro no mesmo estágio de desenvolvimento fisiológico, na presença (●) e na ausência (o) de 50 mM de NaCl.

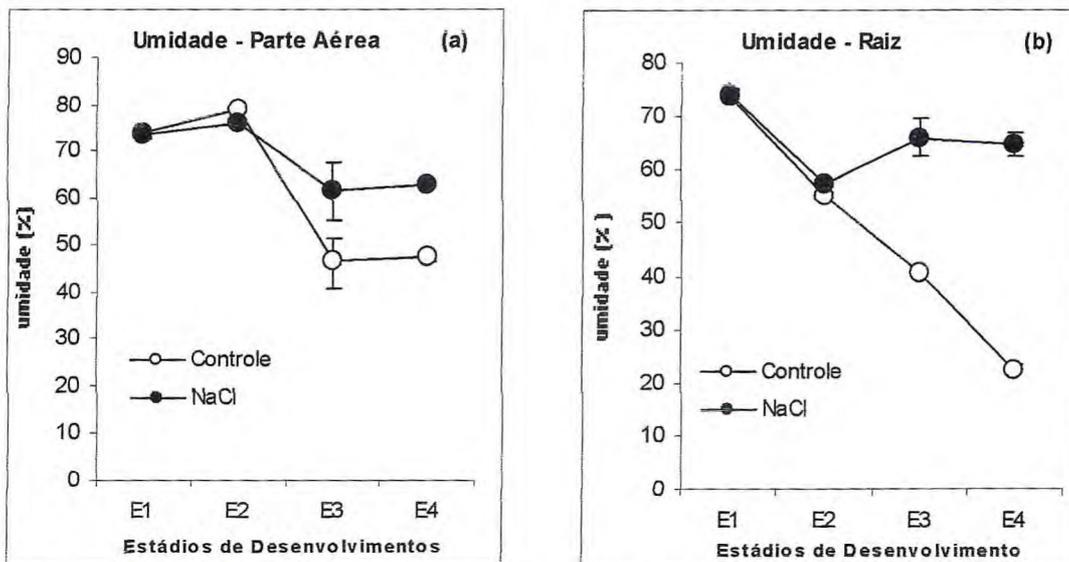


Figura 12. Umidade parte aérea (a) e raiz (b) de plântulas de cajueiro no mesmo estágio de desenvolvimento fisiológico, na presença (●) e na ausência (○) de 50 mM de NaCl.

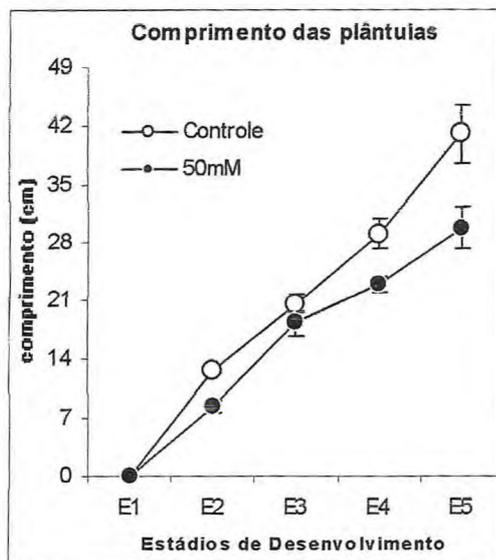


Figura 13. Comprimento das plântulas de cajueiro no mesmo estágio de desenvolvimento fisiológico, na presença (●) e na ausência (○) de 50 mM de NaCl.

2.4 Discussão

De acordo com os resultados, o crescimento e o desenvolvimento das plântulas foram diferenciados quando comparado o tratamento salino com o controle. É possível observar esse comportamento nos resultados da figura 2, onde a germinação (protusão da raiz) e emergência do epicótilo são retardadas nas sementes submetidas ao estresse salino 50 mM. Os dados de embebição e teor de água (figura 3) corroboram com esses resultados, sendo observada uma diminuição do fluxo de água e uma diferença da percentagem de água dos cotilédones durante a germinação. Segundo Ye *et al.* (2005), o estresse salino inibe ou retarda a germinação das sementes e o crescimento das plântulas devido a efeitos osmóticos e/ou iônicos, onde o primeiro distúrbio fisiológico causado pelo estresse salino é a restrição da captação de água devido à diminuição do potencial osmótico do substrato, retardando a embebição das sementes ou o alongamento da raiz. Esses resultados foram observados em diversas espécies como *Adenantha pavonina* L. (Silmará *et al.*, 1999) *Atriplex prostrata* e *Atriplex patula* (Katembe *et al.*, 1998), milho, cana-de-açúcar, arroz e beterraba (Schubert, 2002) e citrus (Adnan, 2004). É importante ressaltar que a percentagem de germinação, de sementes de cajueiro, geralmente chega a superar os 90%, nesse trabalho ficou próxima de 70% possivelmente devido ao lote de castanhas utilizado para realizar o experimento.

A curva de embebição (figura 3 a) quando analisada integralmente mostra um padrão trifásico, onde a fase I (1º ao 6º d) representa a fase de absorção de água propriamente dita, a fase II (7º ao 9º d) representa o intervalo de preparação, onde ocorre a ativação metabólica e a fase III (a partir do 10º d) representando a germinação com a protrusão da raiz e início do crescimento da futura plântula, o que esta de acordo com Castro e Hilhorst, 2004.

A massa fresca das três primeiras coletas dos cotilédones foi maior no tratamento controle, com uma diferença em torno de um grama em relação aos cotilédones do tratamento salino. Já no conteúdo de massa seca dos cotilédones nos dois tratamentos, no mesmo tempo de coleta, não houve diferença. Após a germinação e durante o estabelecimento das plântulas foi observado um declínio abrupto no conteúdo de massa fresca e seca dos cotilédones sob tratamento controle e salino sendo, esse declínio, mais atrasado e lento no tratamento salino (figura 4). Esses resultados confirmam a redução na absorção de água causada pela

presença do NaCl, atrasando a embebição e conseqüentemente a germinação das sementes. As plantas reduzem a transpiração e absorção de água como resposta fisiológica à diminuição do potencial osmótico causada pela presença do NaCl no substrato (Chaves, 1991).

Durante a mobilização das reservas cotiledonares o eixo em crescimento também drena íons para suprir as necessidades iônicas iniciais. Há um importante composto de reserva chamado finitina (mio-inositol hexafosfato) que incrusta os corpos protéicos das sementes e servem para armazenar íons. Estes desempenham importantes funções no metabolismo das plântulas até que a raiz esteja desenvolvida o suficiente para extraí-lo do substrato (Buckeridge *et al.*, 2004).

Estudos identificaram e caracterizaram genes e transportadores responsáveis pela absorção de potássio e sódio no citoplasma das plantas, essa absorção é controlada pelos canais iônicos para manter uma razão potássio e sódio próximo de 1 (Maathuis e Amtmann, 1999). Nos tecidos secos de raízes das sob tratamento salino essa razão diminuiu com o passar do tempo, e na última coleta (24d) a razão potássio sódio foi 0.3. (figura 8 c,d) Essa diminuição é ocasionada mais pela queda de potássio do tecido do que pelo aumento de sódio. Nos tecidos secos de partes aéreas (caule e folha), das mesmas plântulas, a razão potássio sódio foi sempre maior que 1, chegando próximo de 1 na última coleta (figura 8 a,b). Em cotilédones, a razão potássio sódio de todas as coletas foi maior que 1, portanto, o atraso existente no crescimento das plântulas sob tratamento salino não foi devido ao efeito tóxico direto da concentração de sódio no tecido cotiledonar, mais possivelmente, ao efeito osmótico.

A exposição de plântulas em estabelecimento ao estresse salino acarreta distúrbios na captação e na distribuição de nutrientes (Ashraf *et al.*, 2003; Ramoliya *et al.*, 2004), possivelmente o aumento de potássio observado nos cotilédones sob tratamento salino em cajueiro, está relacionado ao desequilíbrio imposto pelo alto conteúdo de sódio, evitando a translocação de potássio para as plântulas em desenvolvimento (figura 5 a). O aumento contínuo de sódio durante o tempo de semeadura em cotilédones e plântulas pode levar a uma redução de K^+ e Ca^{2+} em eixo embrionário de girassol e conseqüentemente em plântulas em desenvolvimento de cajueiro (figura 8 b,d), que ainda dependem das reservas dos cotilédones, provavelmente associado à translocação reduzida destes íons a partir dos cotilédones (Ashraf *et al.*, 2003).

Durante o estabelecimento das plântulas tratadas com NaCl foi observada uma redução do conteúdo de massa seca da parte aérea e raiz comparado com o tratamento controle (figura 6 a,b), possivelmente devido ao atraso da mobilização de reservas dos cotilédones sob o mesmo tratamento. Analisando a percentagem da soma total da massa seca das partes das plântulas (cotilédone, parte aérea e raiz), é possível analisar uma partição atrasada nas plântulas sob tratamento salino, onde no 24° dia a percentagem de massa seca do cotilédone corresponde aproximadamente ao 20° dia do tratamento controle. O atraso foi evidenciado em todos os tempos de coletas e partes das plântulas (figura 7).

O efeito do pré-tratamento com NaCl sobre o estabelecimento de plântulas de uma cultivar de sorgo apresentou plântulas com redução no conteúdo de massa fresca e massa seca e com aumento do conteúdo de Na^+ e Cl^- , conforme o aumento da concentração externa de NaCl (Wahid *et al.*, 1998). Assim, parece que a mobilização de massa seca em cotilédones de caju pode ser regulada por mecanismos do tipo fonte-dreno, os quais sofrem influência da salinidade causada por NaCl, conclusão essa também descrita em cotilédones de caupi (Prisco *et al.*, 1981).

Com objetivo de analisar o atraso da mobilização de massa imposta pelo NaCl nos cotilédones e nas plântulas em desenvolvimento, coletas foram realizadas no mesmo estágio fisiológico dos dois tratamentos. Houve diferença na massa fresca dos cotilédones durante praticamente todas as coletas, onde no tratamento controle a massa fresca foi significativamente maior, devido a maior absorção de água durante a embebição das sementes em vermiculita sem solução salina (figura 9 a). Não ocorreu diferença de massa seca durante a exaustão das reservas dos cotilédones nos estádios analisados (figura 9 b). Essas diferenças estão demonstradas no gráfico da figura 9 C, onde existe uma diferença do teor de água em todos os estádios de coleta, com exceção do último.

Durante o estabelecimento das plântulas sob tratamento salino foi possível observar, a partir do estágio 2, um ganho de massa fresca das partes aéreas e raízes que chega a superar a massa fresca das plântulas sob tratamento controle (figura 10 a,c), que apesar das plântulas estarem sob tratamento salino, houve uma tendência de absorverem maior quantidade de água do substrato a partir do segundo estágio, possivelmente com o propósito de quebrar a "barreira" imposta pela redução do potencial osmótico devido a presença do NaCl, ou seja, um

ajustamento osmótico estaria ocorrendo para que as plântulas pudessem continuar seu crescimento. Essa hipótese é reforçada pelos resultados apresentados na figura 11, onde o teor de água, a partir do segundo estágio das partes aéreas e raízes sob tratamento salino, são nitidamente maiores quando comparado com o do tratamento controle.

As plântulas submetidas ao tratamento controle tiveram massa seca das partes aéreas e raízes maior que as submetidas ao tratamento salino (figuras 10 b e d). Esse resultado não corrobora com o sincronismo da mobilização da massa seca dos cotilédones (figura 9 b), que possuem massas iguais nos dois tratamentos. Em alguns casos em que o desenvolvimento da plântula leva vários dias, a mobilização de reservas pode apresentar sincronismo com a fotossíntese durante o estabelecimento nas folhas em expansão (Buckeridge, 2004), reforçando o ganho de massa seca das partes aéreas e raízes das plântulas de cajueiro (figura 10 b,d) sob tratamento controle, já que elas se encontram com as folhas mais desenvolvidas.

A diferença existente da massa seca das partes aéreas e raízes nos tratamentos analisados, apesar das coletas terem sido no mesmo estágio fisiológico, provavelmente foi motivada por coletas realizadas de plântulas sob tratamento salino com atraso no estágio de desenvolvimento, esse resultado é reforçado com o gráfico do comprimento das plântulas (figura 12).

2.5 Conclusão

O efeito osmótico e não o efeito tóxico afeta o crescimento das plântulas e a redução de fitomassa em cotilédones de cajueiro submetidos ao estresse salino.

2.6 Referências Bibliográficas

ADNAN Al-Yassin. Influence of Salinity on Citrus: A Review Paper. **Journal of Central European Agriculture** V.5 N° 4, p.263-272, 2004.

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

BEZERRA, I.L., GHEYI, H.R., FERNANDES, P.D., SANTOS, F.J.S., GURGEL, M.T., NOBRE, R.G. Germinação, formação de porta-enxerto e enxertia de cajueiro-anão precoce sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 6, n. 3, p. 420-424, 2002.

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

BEZERRA, I.L., GHEYI, H.R., FERNANDES, P.D., SANTOS, F.J.S., GURGEL, M.T., NOBRE, R.G. Germinação, formação de porta-enxerto e enxertia de cajueiro-anão precoce sob estresse salino. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. v. 6, n. 3, p. 420-424, 2002.

BUCKERIDGE M. S, AIDAR M. P. M, SANTOS H. P, TINÉ M. A. S. Acúmulo de reservas. In: Ferreira AG, Borghetti F, editors. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p.33, 2004.

CASTRO, R. D., HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p 151, 2004.

CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, v.42, n.234, p.1-16, 1991.

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

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

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

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

KRAMER, D. Cytological aspects of salt tolerance in higher plants. In: STAPLES, C.; TOENNIESSEN G.H. (eds.) **Salinity tolerance in plants: Strategies for crop improvement**. New York: John Wiley & Sons, p.3-15, 1984.

MAAS, E.V. Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research*, New York, v.1, p.12-36, 1986.

MAAS, E.V.; HOFFMAN, G.J. Crop salt tolerance – current assessment. *Journal of Irrigation and Drainage Division*; New York, v.103, p.115-134, 1977.

MAATHUIS, F. J. M. and ANNA AMTMANN. K⁺ Nutrition and Na⁺ Toxicity: The Basis of Cellular K⁺/Na⁺ Ratios. **BOTANICAL BRIEFING**. *Annals of Botany* v.84: p.123-33, 1999

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

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

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

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

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

SCHUBERT SVEN. Salt Sensitivity of Rice, Maize, Sugar Beet, and Cotton During Germination and Early Vegetative Growth. **Inaugural Dissertation** Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics and Environmental Management, 2002.

SILMARA CRISTINA FANTI E SONIA CRISTINA JULIANO GUALTIERI DE ANDRADE PEREZ. Influência do Substrato e do Envelhecimento Acelerado na Germinação de Olho-de-Dragão (*Adenanthera pavonina* L. - Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, nº 2, p.135-141, 1999.

SILVA, J.M.A.; SILVA, P.M. Diagnóstico de produção e comercialização de mudas e sementes de espécies frutíferas na região Nordeste do Brasil. Viçosa: UFV; DER; FUNARBE, p.215, 1999.

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

WINICOV, I. New Molecular Approaches to Improving Salt tolerance in Crop Plants. **Annals of Botany**. V.82, p. 703-710, 1998.

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

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

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

**Controle fonte-dreno da mobilização das reservas orgânicas de
cotilédones durante o estabelecimento da plântula de cajueiro
(*Anacardium occidentale* L.) sob salinidade com NaCl**

3.1 Introdução

As reservas das sementes têm basicamente duas funções que se relacionam com a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula que apresente a capacidade de se manter de forma autotrófica. Os compostos acumulados durante a maturação da semente podem servir como fonte de energia e de matéria, pois os compostos de carbono normalmente acumulados em sementes podem ser utilizados tanto para produzir energia como para construir fisicamente as células (Buckeridge *et al.*, 2004).

Há enorme variação na composição de sementes, mas as substâncias armazenadas em grande quantidade constituem os carboidratos, os lipídios e as proteínas. Os dois primeiros servem como fonte de energia e carbono para a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas, enquanto as proteínas têm como função armazenar principalmente nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários na plântula em crescimento (Buckeridge *et al.*, 2004).

O principal sistema de classificação de proteínas vegetais, com base na solubilidade em uma série de solventes foi desenvolvido por Osborne (1924). A fração globulina é solúvel em soluções salinas, mas insolúveis em água. A fração albumina é solúvel em água e tampões diluídos com pH neutro. A fração prolamina é solúvel em álcool diluído (60-70%), mas não é em água e soluções salinas. A fração glutelina é solúvel em soluções ácidas ou básicas diluídas. Classificações mais modernas de proteínas vegetais baseiam-se em dois critérios: função e relações bioquímicas e moleculares. Em termos de função, podemos classificá-las em três classes principais: a) proteínas de reserva; b) proteínas estruturais e c) proteínas metabólicas e proteção (Bewley, 2001).

As globulinas são as principais proteínas de reserva de sementes de dicotiledôneas, especialmente as leguminosas. Já as prolaminas e glutelinas são as proteínas de reserva mais comuns em sementes de monocotiledôneas, como os cereais. Já as albuminas são amplamente distribuídas (Bewley e Black, 1994).

As proteínas de reserva de sementes fornecem aminoácidos livres durante sua mobilização, os quais são utilizados na biossíntese de outras proteínas ou compostos nitrogenados na plântula em desenvolvimento (Bewley e Black, 1994). O acúmulo de proteínas de reserva ocorre durante a metade e último estágio de

maturação das sementes. Elas são depositadas em compartimentos ligados à membrana, os corpos protéicos, os quais são gerados ou diretamente a partir do retículo endoplasmático, como em milho, ou em vacúolos de estocagem de proteínas como na maioria das espécies. Durante este período de deposição, a degradação de proteínas de reservas é livre de hidrólise indicando que as proteínas são protegidas contra ataque proteolítico prematuro (Müntz, K. 2001). A síntese e a deposição dessas proteínas estão sujeitas a uma regulação espacial e temporal, sendo que, em cada espécie, podem aparecer em diferentes estágios do desenvolvimento (Herman e Larkins, 1999).

Na maioria das dicotiledôneas e das gimnospermas, a formação dos corpos protéicos envolve a fragmentação de um grande vacúolo central após as proteínas de reservas terem sido transportadas dos locais de síntese. Em geral, o transporte das proteínas de reserva pode ocorrer por meio do complexo de Golgi (glutelinas do arroz, algumas prolaminas de trigo e globulinas das leguminosas), mas, em alguns cereais, ocorre à formação direta do corpo protéico a partir do retículo endoplasmático rugoso. Em monocotiledônea o corpo protéico pode ser simplesmente uma agregação de proteínas de reserva que são lançadas no citoplasma sem qualquer membrana de proteção. Pode ainda ser formada pela ruptura do retículo endoplasmático, onde as proteínas de reservas são sintetizadas. (Buckeridge *et al.*, 2004).

De modo geral, os processos de mobilização (independente do tipo de reserva) consistem em sincronizar o crescimento e o desenvolvimento da plântula, oriunda da germinação, no sentido de produzir um indivíduo autotrófico que seja capaz de se adaptar e responder às condições ambientais vigentes (Bewley, 2001). O estresse salino induz diversas alterações no metabolismo das plantas, sendo a rápida e acentuada redução no crescimento um dos seus efeitos mais marcantes. A alta concentração de sais no solo pode provocar a diminuição do potencial hídrico do solo que promove a perda de água das células para o meio externo por osmose (Munns, 1993; Yeo, 1998).

Durante o estabelecimento das plântulas, a captação de água acarreta a acumulação de íons nos tecidos (Wahid *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2003). Ao atingir concentrações tóxicas, os íons acumulados podem afetar vários processos fisiológicos e metabólicos dos tecidos, incluindo a divisão celular, a diferenciação celular, a atividade de enzimas e a captação e distribuição de nutrientes (Wahid *et*

al., 1998; Croser *et al.*, 2001; Ramoliya e Padey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003; Misra e Dwivedi, 2004). Assim, a toxicidade iônica pode ocasionar o atraso da emergência das plântulas (Wahid *et al.*, 1998; Croser *et al.*, 2001; Ramoliya e Padey, 2002; Ramoliya e Padey, 2003; Joshi *et al.*, 2005) e da mobilização das reservas (Wahid *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2003; Prisco e Vieira, 1976; Prisco *et al.*, 1981) ou até diminuir a viabilidade das sementes (Wahid *et al.*, 1998; Ramoliya e Padey, 2003; Ashraf *et al.*, 2003) ou aumentar a mortalidade das plântulas (Croser *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2005).

Em algumas espécies vegetais, como sorgo, trigo e caupi, os efeitos da salinidade são mais acentuados durante a germinação e crescimento inicial das plântulas. Em outras espécies, os efeitos da salinidade são mais drásticos após o estabelecimento da plântula e início da fase de plena atividade fotossintética das folhas (Fageria e Gheyi, 1997).

Nenhum estudo foi encontrado em relação aos mecanismos induzidos pela salinidade sobre os processos bioquímicos da germinação das sementes de cajueiro. O conhecimento a respeito de quais produtos das reservas cotiledonares possuem sua mobilização mais limitada pelo estresse salino, e quais suas conseqüências no crescimento inicial das diferentes partes da plântula, poderão contribuir para uma melhor compreensão da fisiologia do estresse salino, assim como abrir perspectivas na seleção de genótipos mais tolerantes.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Obtenção dos tecidos para análise

Plântulas de cajueiro foram obtidas de castanhas tratadas e semeadas nas mesmas condições descritas do item **2.2.2 do capítulo 2** com finalidade de analisar a mobilização das reservas orgânicas. No entanto, os vasos foram mantidos em condições de casa de vegetação por 30 dias. Os estádios escolhidos para coletas foram: emissão da radícula – 10 dias após o semeio (DAS); emissão das folhas primárias (FP) – 14 DAS; expansão das FP – 18 DAS; FP totalmente expandidas – 22 DAS, expansão das folhas secundárias (FS) – 26 DAS e folhas secundárias totalmente expandidas – 30 DAS. Foram coletadas três plântulas (repetições) por tempo de cada tratamento. Três cotilédones (um de cada repetição)

foram utilizados para análises bioquímicas. Os cotilédones separados para análises bioquímicas foram pesados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, sendo transferidos para freezer -80°C para determinações posteriores.

3.2.2 Extração de Proteínas Solúveis

Amostras com 1 g de massa fresca de eixos ou cotilédones foram maceradas com nitrogênio líquido e extraídas com 5 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 contendo EDTA 2 mM, ditioneitol 2 mM e PEG 6000 3% (m/v). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 20 min a 4 °C e o sobrenadante coletado e armazenado a -80 °C. As proteínas solúveis destes extratos foram quantificadas de acordo com o método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

3.2.3 Aminoácidos Livres Totais (AALT)

A concentração dos aminoácidos livres totais (AALT) foi determinada pelo método de PEOPLES *et al.*, (1989). Amostras de tecidos frescos de cotilédones foram submetidas à extração a 100 °C por 30 min, em proporção de 200 mg da amostra para 5 mL de água deionizada. A reação para dosagem de aminoácidos livres totais foi conduzida em tubos de ensaio contendo uma alíquota de 0,1 mL de extrato, em presença de 0,25 mL de uma solução tamponada a pH 5,0 contendo 0,2 M de citrato, 0,25 mL do reagente de ninhidrina (KCN 0,10 mM e ninhidrina 5% em metoxietanol e 0,4 mL de água destilada). Após homogeneização, os tubos hermeticamente fechados foram mantidos em banho-maria a 100 °C por 15 min. A reação foi interrompida pela redução da temperatura do meio mediante contato dos tubos de ensaio com água a 2 °C e adicionados de 1,5 mL de etanol 50% (v/v). As absorvâncias foram medidas a 570 nm. Os teores de aminoácidos livres totais foram determinados utilizando L-glutamina como padrão.

3.2.4 Açúcares solúveis totais

A extração de açúcares solúveis totais de cotilédones (liofilizados e delipidados) e folhas liofilizadas seguiu o protocolo descrito por Silveira *et al.*, (1990),

conforme figura 1. A concentração de açúcares solúveis totais foi determinada com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de uma solução estoque de glicose (1g/100mL H₂O) diluída 100 vezes em água deionizada (Dubois et al., 1956).

3.2.5 Amido

A extração de amido das amostras de cotilédones (liofilizados e delipidados) foi realizada segundo o protocolo de Silveira *et al* (1990), conforme figura 1. A concentração de amido foi determinada com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de uma solução estoque de glicose (1g/100mL H₂O) diluída 100 vezes em ácido perclórico 30% (Dubois et al., 1956).

3.2.6 Lipídios

A percentagem de lipídios nos cotilédones foi determinada seguindo a metodologia descrita por Cavalcante Júnior (1994). Amostras de 500 mg de tecido liofilizado de cotilédones foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de hexano (extração a 22 ° C), procedendo a extração de lipídios por 3 horas. Em seguida, os tubos foram levados à estufa por 72 horas a 60 °C para evaporação do hexano. Após a evaporação, a percentagem de lipídios nas amostras foi determinada por diferenças de pesagens entre o peso inicial dos tubos e o peso final.

3.2.7 Determinação de prolina, arginina, ornitina, glutamina e asparagina

Amostras de 50 mg de cotilédone liofilizado e delipidado extraídas com metanol: clorofórmio: água (15: 5: 3) a temperatura ambiente durante 30 minutos (Mitchell and Madore, 1992). A quantificação de cada aminoácido foi realizada em HPLC (Waters Corporation) usando uma coluna Pico-Tag C18, de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de aminoácidos livres foi realizada comparada os picos obtidos das amostras com o obtido dos aminoácidos padrão.

3.2.8 Fracionamento Protéico

Globulinas, albuminas e prolaminas foram extraídas e fracionadas de amostras de 1 g de cotilédones liofilizados e delipidados de acordo com Osborne (1924) com algumas modificações. Inicialmente, as amostras foram extraídas com 10 mL de tampão Tris-HCl 25 mM pH 7.6 e centrifugadas a 10.000 x g durante 20 minutos. O precipitado foi extraído e centrifugado novamente sob as mesmas condições, obtendo um resíduo e dois sobrenadantes, que foram juntados para fornecer um extrato bruto. O extrato bruto foi dializado contra água destilada e centrifugado a 10.000 x g por 30 min. O precipitado foi dissolvido em água destilada, fornecendo a fração globulina e o sobrenadante fornecendo a fração albumina. O resíduo inicial foi extraído com etanol 70% (v/v) e centrifugado a 10.000 x g durante 20 minutos. O sobrenadante corresponde à fração prolamina e o precipitado foi descartado. Todas as frações protéicas foram liofilizadas e o conteúdo de proteínas foi quantificado de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando como base uma curva padrão ajustada partir de concentrações crescentes de albumina sérica bovina.

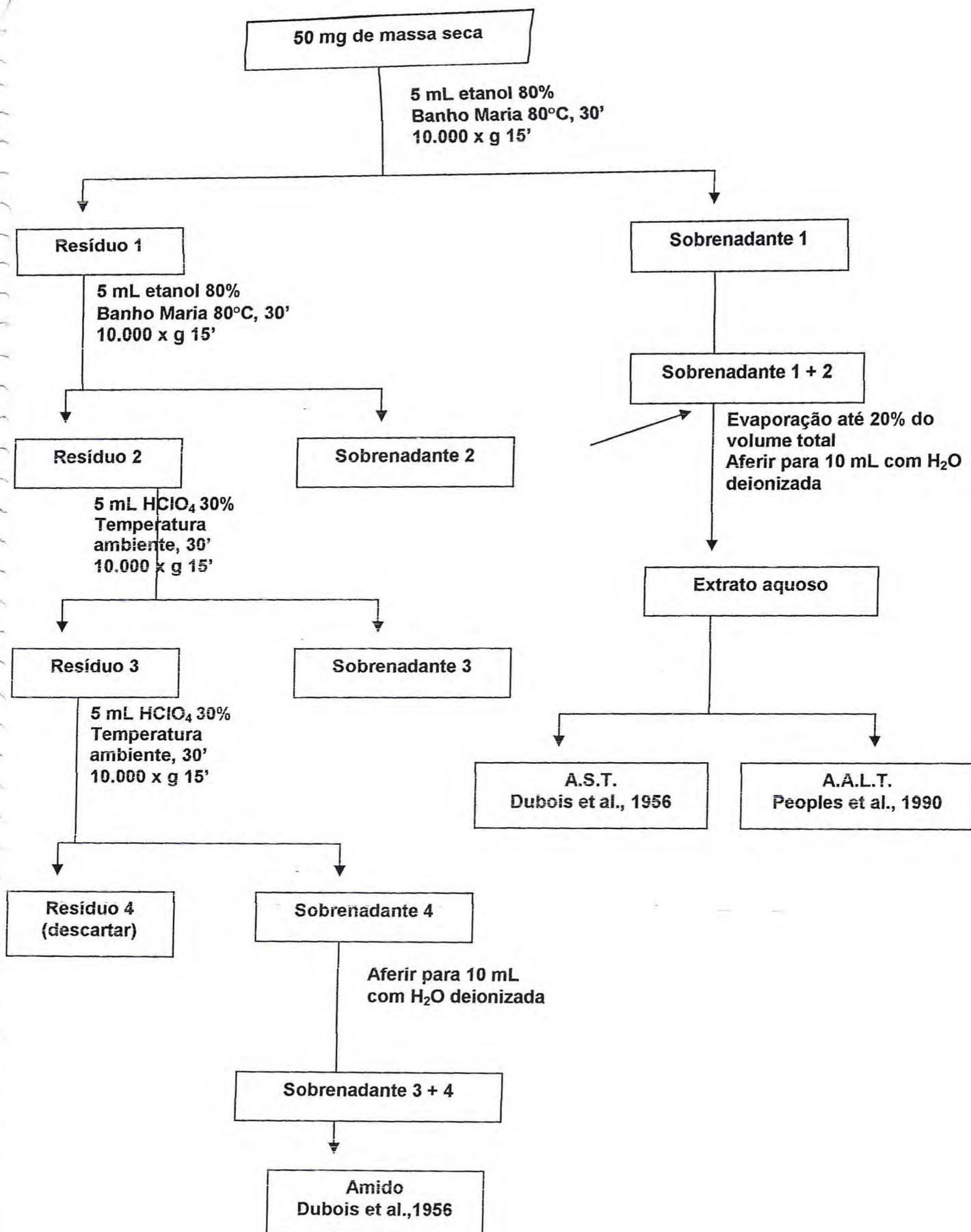


Figura 01 – Esquema de extração para determinação de amido em cotilédones. Extração de açúcares solúveis totais e aminoácidos livres totais em cotilédones e folhas.

3.3 Resultados

No processo de estabelecimentos das plântulas de cajueiro a acumulação da massa seca nos eixos em crescimento (figura 1a) foi coordenada com a queda da massa seca nos cotilédones de plântulas sob tratamento controle e salino. Entretanto, o tratamento com NaCl retardou esse processo especialmente no final do estabelecimento das plântulas, desde da emergência das folhas primárias (18 d) até a emergência das folhas secundárias (26 d). No final do experimento as plântulas tratadas com sal e controle mostraram o mesmo conteúdo de massa seca nos eixos em crescimento e nos cotilédones.

A mobilização de proteína nas plântulas controle foi constante, desde a emergência do epicótilo (14 d) até a total expansão das folhas primárias (22 d) (figura 2a), acompanhando a perda da massa seca nos cotilédones (figura 1b). Em comparação, a mobilização de proteínas nas plântulas tratadas com sal foi retardada da protrusão da raiz (10 d) até emergência das folhas secundárias (26 d).

Decréscimo de lipídios ocorreu precocemente nas plântulas controle, ocorrendo desde a protrusão da raiz (10 d) a expansão total das folhas primárias (22 d) (figura 2b). Como a mobilização de proteínas, o decréscimo de lipídios acompanhou a perda da massa seca nos cotilédones (figura 1b). O tratamento com sal retardou o decréscimo no final do crescimento das plântulas, desde a emergência de folhas primárias (14 d) até a emergência de folhas secundárias.

O conteúdo de amido (figura 2c) e açúcares solúvel (figura 2d) aumentaram nas plântulas tratadas com sal e controle desde a protrusão da radícula (10 d) até a emergência de folhas primárias (18 d), depois diminuí até o final do experimento. O tratamento com sal não afetou a acumulação de amido, mas reduziu a acumulação de açúcares solúvel até a emergência das folhas primárias (18 d). Em adição, o conteúdo de amido e açúcares solúvel diminuí rapidamente nas plântulas do tratamento controle do que a do tratamento salino até a emergência das folhas secundárias.

As três maiores frações das proteínas de reservas de cajueiro corresponde as globulinas, prolaminas e albuminas, na ordem decrescente (figura 3). Até a protrusão da radícula (10 d), os cotilédones das plântulas controle mostraram alto conteúdo de globulinas (250 mg/cot.) e baixo conteúdo de prolaminas (13 mg/cot.) e albuminas (3.7 mg/cot.). Globulinas (figura 3a) e albuminas (figura 3b) foram mobilizadas mais

rápido que prolaminas (figura 3c) principalmente até a emergência do epicótilo (14 d). Nas plântulas tratadas com NaCl, a mobilização de globulinas e prolaminas foi retardada desde a expansão total das folhas primárias (14 d), enquanto a mobilização de albuminas foi retardada precocemente, desde a emergência das folhas primárias (18 d).

O conteúdo de aminoácidos livres em ambos os tratamentos durante a emergência das folhas primárias (14 d) (figura 4a), coincide com intensa mobilização de globulinas e albuminas (figura 3a e 3b, respectivamente). Embora, as plântulas do tratamento salino acumulem menos aminoácidos livres do que as plântulas controle. Em adição, o conteúdo de aminoácidos livres diminui desde a emergência das folhas primárias (18 d) até o fim do experimento (30 d). Durante esse período, as plântulas tratadas com sal apresentaram alto conteúdo de aminoácidos livres que as plântulas controle.

O tratamento salino não provocou uma acumulação proeminente de prolina nas plântulas de cajueiro (figura 4 b). Nas plântulas do tratamento controle e salino, o conteúdo de prolina aumentou na emergência do epicótilo (14 d) e diminuiu durante o estabelecimento das plântulas. As plântulas tratadas com sal apresentaram atraso no conteúdo de prolina em comparação às plântulas controle somente durante a expansão total das folhas primárias (22 d) e a emergência das folhas secundárias (26 d).

Dos aminoácidos analisados os mais importantes quantitativamente foram arginina (figura 4c), glutamina (figura 4e) e asparagina (figura 4f), na ordem decrescente. Como o conteúdo de aminoácidos livres (figura 4a), o conteúdo de arginina, glutamina e asparagina aumentou durante a emergência do epicótilo (14 d) e depois diminuiu até a expansão total das folhas secundárias (30 d). Desde a expansão das folhas primárias (22 d), o conteúdo desses aminoácidos diminuiu mais rapidamente nas plântulas controle do que nas plântulas do tratamento salino. Dentre os aminoácidos livres examinados, somente a ornitina foi progressivamente acumulada durante o estabelecimento das plântulas, especialmente nas plântulas tratadas com sal (figura 4 d).

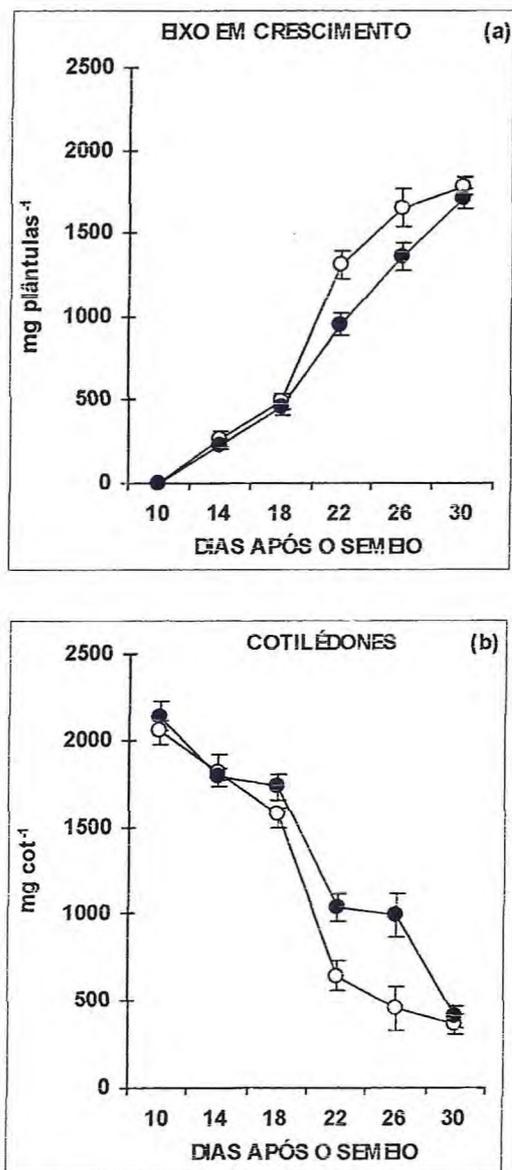


Figura 02 – Efeito do NaCl na variação da matéria seca nos cotilédones (a) e eixos em crescimento (b) durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro. (○) controle; (●) 50 mM NaCl.

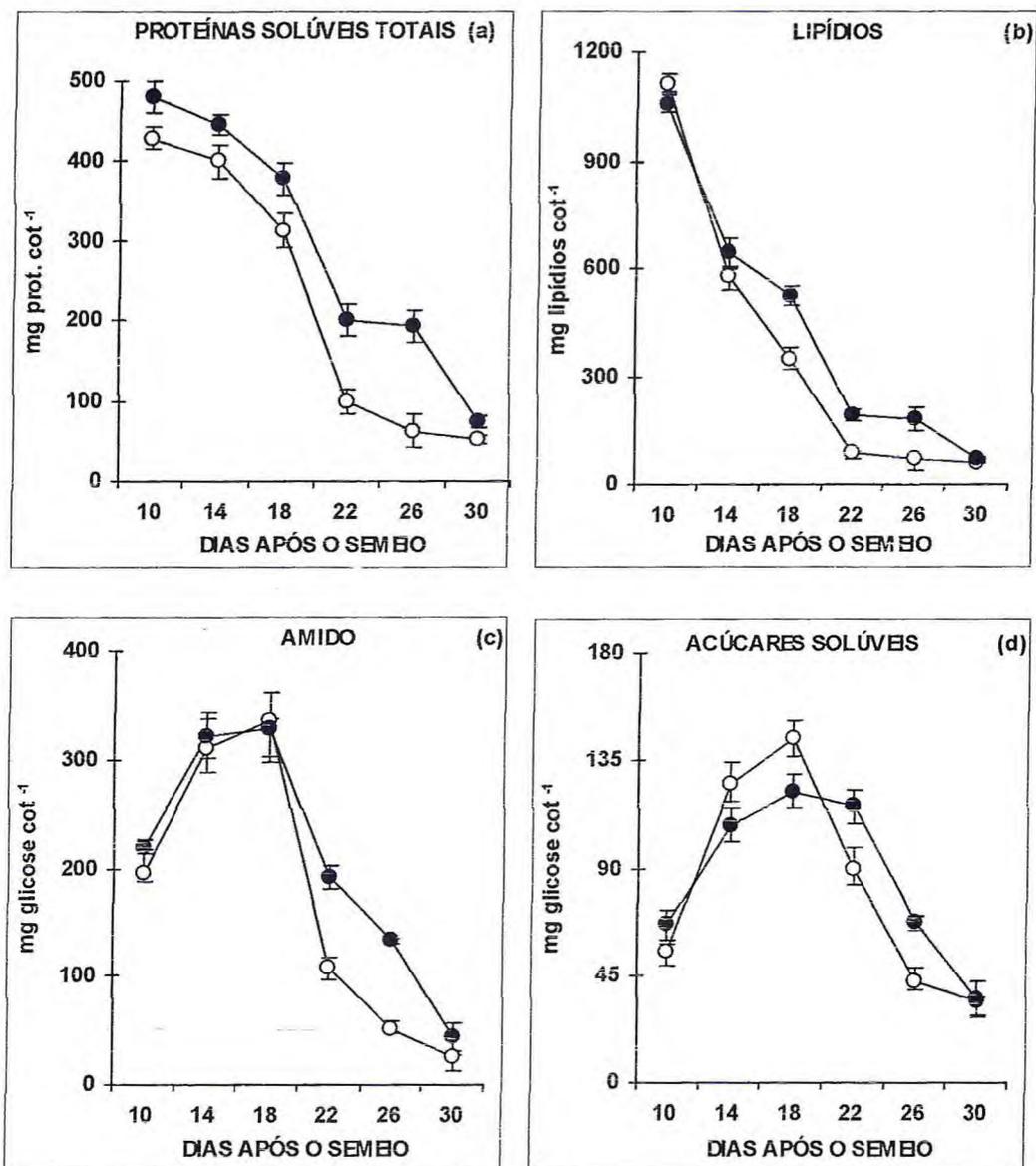


Figura 03 – Efeito do NaCl na variação do conteúdo de proteínas (a), lipídios (b), amido (c) e açúcares solúvel (d) nos cotilédones de plântulas de cajueiro ao longo da mobilização das reservas. (○) control; (●) 50 mM NaCl.

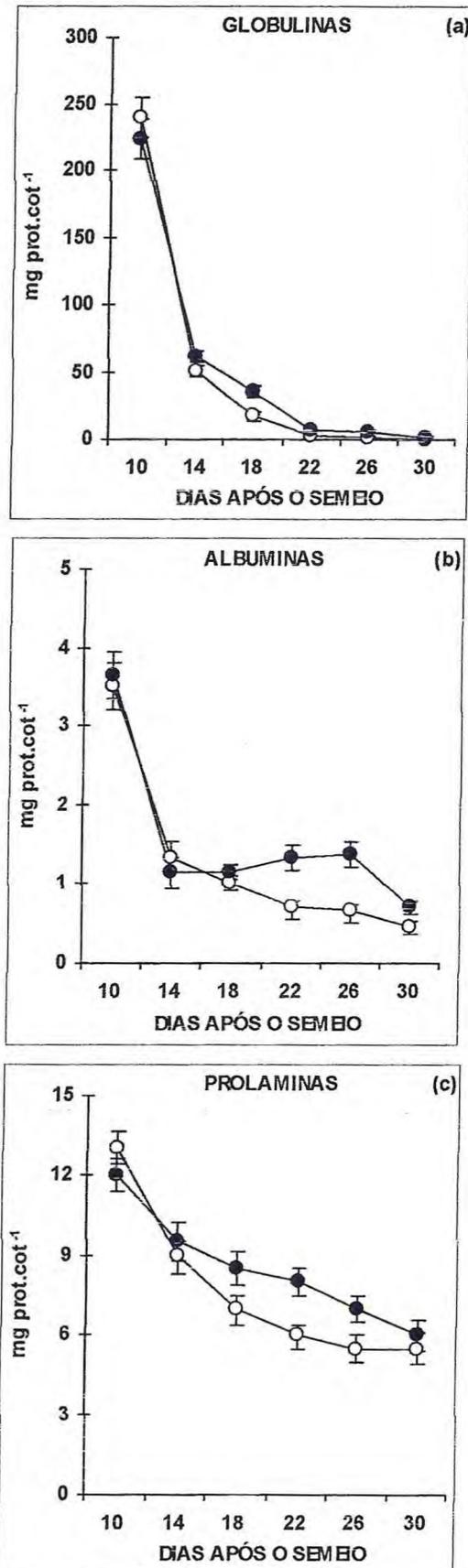


Figura 04 – Efeito do NaCl na mobilização das reservas de globulinas (a), albuminas (b) e prolaminas (c) nos cotilédones, durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro. (○) control; (●) 50 mM NaCl.

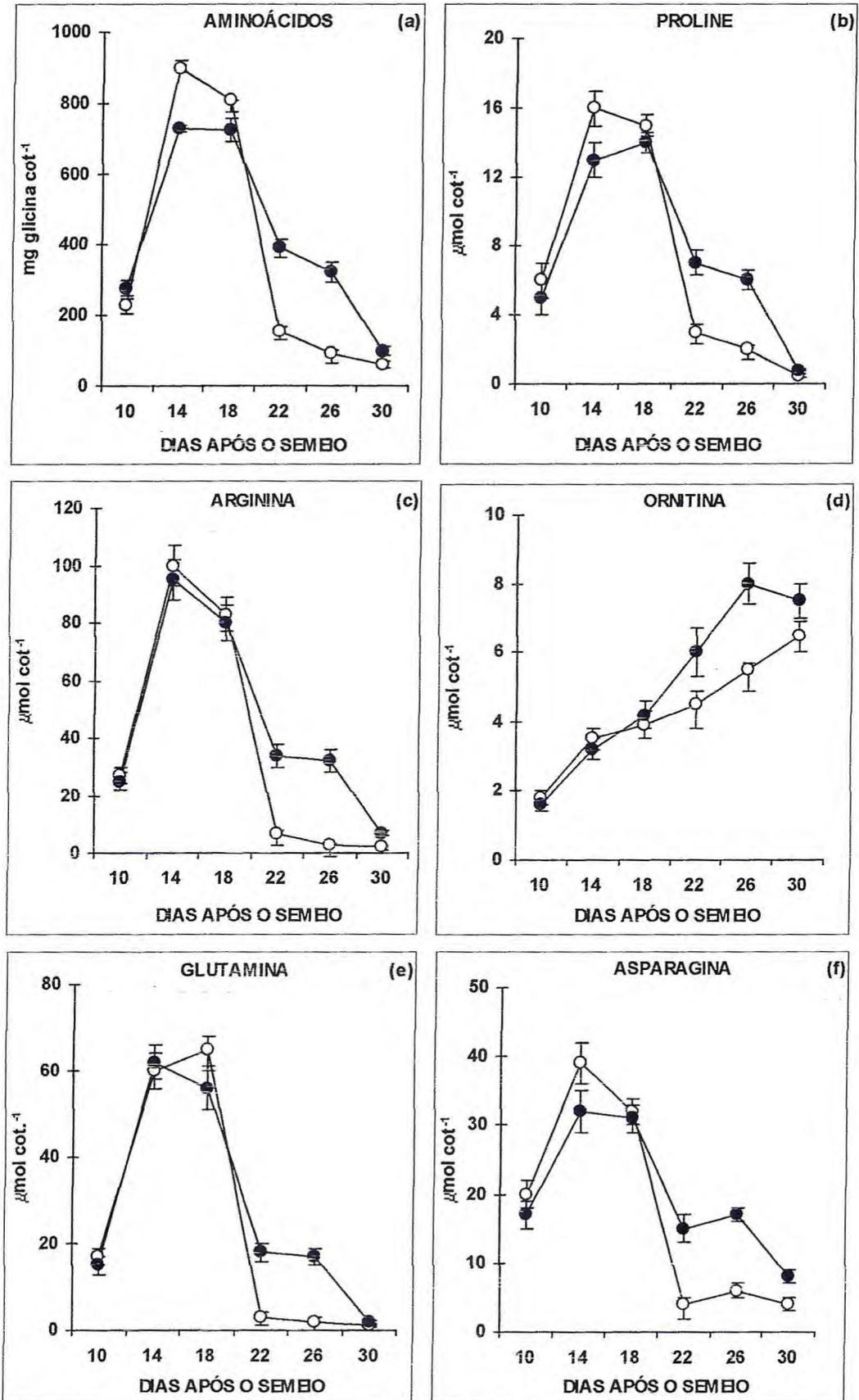


Figura 05 – Efeito do NaCl na variação do conteúdo de aminoácidos livres totais (a), prolina (b), arginina (c) ornitina (d), glutamina (e) e asparagina (f) nos cotilédones durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro (○) control; (●) 50 mM NaCl.

3.4 Discussão

Os cotilédones das plântulas de cajueiro apresentam lipídios como sua principal reserva de nutriente (figura 2c), seguido por proteínas (figura 2a) e amido (figura 2b), caracterizando as castanhas do caju como sementes oleaginosas. Durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro, a mobilização das reservas foi caracterizada pela diminuição coordenada do conteúdo de massa seca (figura 1c), proteínas (figura 2a) lipídios (figura 2b) e amido (figura 2c) nos cotilédones e o aumento de massa seca no eixo em crescimento (figura 1a).

Intenso declínio de lipídios (figura 2b) durante a protrusão da radícula (10 d) e a emergência do epicótilo (14 d) coincide com acumulação de açúcares solúveis (figura 2d) e amido (figura 2c) nos cotilédones das plântulas de cajueiro, indicando biossíntese de carboidratos pelos lipídios através da gliconeogênese (Bewley e Black, 1994). Esses resultados confirmam que os lipídios têm como principal papel de reservas de nutrientes em plântulas de cajueiro imediatamente após a germinação. Adicionalmente, amido foi sintetizado como uma reserva de nutrientes transiente (figura 2c) produzindo açúcares solúveis para transporte de carbono nos eixos em crescimento nos últimos estádios (figura 2d). Declínio do conteúdo de lipídios durante o desenvolvimento inicial das plântulas de cajueiro foi estudado previamente (Cavalcanti júnior, 1994), mas seu possível papel na biossíntese de carboidratos transientes não foi investigado. Além disso, lipídios foram anteriormente caracterizados como fonte de carbonos ao crescimento de plântulas para outras espécies cultivadas, incluindo jojoba (Kayani *et al.*, 1990) e girassol (Ashraf *et al.*, 2003).

Como esperado, as globulinas foram as maiores proteínas de reservas encontradas nos cotilédones de plântulas de cajueiro (figura 3a). Essas proteínas de reservas foram comumente encontradas nas dicotiledôneas (Bewley e Black, 1994). Os cotilédones de plântulas de cajueiro também apresentaram considerável conteúdo de prolaminas (figura 3c), conhecidas como as principais proteínas de reservas de monocotiledôneas (Bewley e Black, 1994). Levando em consideração que as globulinas (figura 3a) e albuminas (figura 3b) foram mobilizadas mais rápido que as prolaminas durante a protrusão da radícula (10 d) e a emergência do epicótilo (14 d), prolaminas provavelmente tem um papel como proteínas de reservas secundárias em plântulas de cajueiro.

A salinidade retarda notavelmente a mobilização de reserva durante estabelecimento das plântulas de cajueiro. A mobilização de proteínas (figura 2a) foi bastante afetada pelo estresse salino, visto que foi retardada desde a protrusão da raiz (10 d). Em comparação, a mobilização de lipídios (figura 2b) e amido (figura 2c) foi afetada depois da emergência (18 d) e expansão total das folhas primárias (22 d), respectivamente. Embora, a mobilização de toda reservas de nutrientes foi fortemente retardadas durante a emergência das folhas secundárias (26 d) e foi recuperada no final do experimento (30 d).

A mobilização das reservas foi diferencialmente afetada pelo estresse salino em cajueiro e outras espécies de cultivo. A mobilização de proteínas foi retardada pela salinidade com NaCl desde a germinação das sementes em cajueiro, até o final do estabelecimento das plântulas em feijão (Prisco e Vieira, 1976) e ela não foi afetada até o completo crescimento das plântulas de milho (Ashraf and Wahid, 2000) e girassol (Ashraf, 2003). Em adição, o decréscimo de lipídios foi retardado pelo estresse salino durante a germinação em jojoba (Kayani et al., 1990), milho (Ashraf and Wahid, 2000) e girassol (Ashraf, 2003), em cotilédones de cajueiro o atraso da mobilização de lipídios ocorreu durante o estabelecimento das plântulas. Considerando que a mobilização das proteínas foi mais severamente afetada pela salinidade com NaCl do que a degradação de lipídios em cajueiro, parece que a mobilização das proteínas consiste num importante processo limitante para o desenvolvimento inicial das plântulas sob estresse salino.

Durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro, a salinidade afeta concomitantemente o crescimento das plântulas (figura 1a), mobilização das reservas (figura 2a, 2b e 2c), aminoácidos livres (figura 4a) e acumulação de açúcares solúveis nos cotilédones. Nos estádios iniciais (10-18 d) o estresse salino não inibiu o crescimento das plântulas, mas retardou fortemente a mobilização de proteínas e lipídios, restringindo aminoácidos livres e acumulação de açúcares solúveis respectivamente. Nos estádios finais (22-30 d), o estresse salino limitou o crescimento das plântulas, atrasou fortemente a mobilização das proteínas e lipídios e aumentou a acumulação de aminoácidos livres e açúcares solúveis.

Conforme estas evidências, a inibição do crescimento induzida por sal provavelmente reduz o eixo em crescimento caindo à força dreno e diminuindo o transporte de carbono e nitrogênio. Então, a retenção de aminoácidos livres e açúcares solúveis nos cotilédones poderá abaixar a mobilização de reservas regular

pelo mecanismo de retroalimentação dependendo dos compostos de produtos de hidrólise.

O controle da mobilização das reservas tem sido geralmente atribuído aos mecanismos hormonal ou fonte-dreno (Bewley e Black, 1994). Em dicotiledôneas, parece que auxinas promovem mobilização de reservas e o ácido abscísico antagoniza sua ação (Buckeridge *et al.*, 2004). No outro lado, a força dreno dos eixos em crescimento poderá influenciar a atividade metabólica da fonte cotiledonar (Bewley and Black, 1994). Contudo distúrbios hormonais causados pela salinidade com NaCl não poderá ser descartado, os resultados do corrente trabalho evidencia que a mobilização das reservas foi possivelmente controlada pelo mecanismo fonte-dreno em plântulas de caju sob estresse salino.

Corroborando com essa hipótese fonte-dreno, arginina (figura 4c), ornitina (figura 4d), glutamina (figura 4e) e asparagina (figura 4f) foram notadamente retidos nos cotilédones de plântulas de cajueiro tratadas com sal quando a mobilização das proteínas (figura 4f) foram fortemente retidas (22-26 d). Glutamina e asparagina são as principais amidas transportadoras de nitrogênio em plantas superiores (Buchanan *et al.*, 2000) e arginina produzindo ornitina como transportadores de nitrogênio em espécies lenhosas (Nabais *et al.*, 2005). Então a acumulação desses aminoácidos nos cotilédones reforça fortemente que o transporte de nitrogênio reduzido em plântulas de cajueiro sob estresse salino.

Complementariamente, prolina não foi consideravelmente acumulada nos cotilédones de plântulas de cajueiro tratadas com sal (figura 4b). Acumulação de prolina tem sido relatada como ajustamento osmótico e estabilidade da estruturas de proteína sob estresse salino (Buchanan *et al.*, 2000; Thakur e Sharma, 2005). Nesse caminho, pequena acumulação de prolina nas plântulas de cajueiro tratadas com sal foi provavelmente uma conseqüência de distúrbios no transporte e metabolismo de nitrogênio (Silveira *et al.*, 2003).

O metabolismo dos compostos de reserva acaba gerando uma grande quantidade de açúcares livres e aminoácidos no tecido de reserva das plantas e estes são transportados para os tecidos em crescimento (Buckeridge *et al.*, 2000b). Nos cotilédones de cajueiro esse aumento foi evidenciado até 14° dia, quando o epicótilo emergiu (figura 2d e figura 4a) e o processo de dreno se intensificou. Quando a taxa de crescimento do embrião for compatível com a produção e o transporte de sacarose nos tecidos de reservas, o processo de mobilização é

definido como contínuo (Buckeridge *et al.*, 2000b). Esse fenômeno é observado no eixo e nos cotilédones de cajueiro (figura 1d e figura 2d), onde o decréscimo de lipídios e amido dos cotilédones são responsáveis pelo fornecimento de açúcares a serem mobilizados para o eixo em crescimento durante o estabelecimento da plântula (figura 2b, 2c). A mobilização das reservas poderá ser interrompida se a plântula sofrer uma diminuição ou parada no processo de desenvolvimento, pois o excesso de acúmulo de açúcares na plântula leva a um aumento nos níveis de radicais livres e consumo de energia para manter os tecidos vivos. Em relação à mobilização de reservas de proteínas, um sistema de controle análogo ao descrito acima deva existir para aminoácidos, com finalidade de controlar a distribuição de compostos nitrogenados na plântula em desenvolvimento, mas pouco é conhecido desse sistema (Buckeridge *et al.*, 2000b)

3.5 Conclusão

Esse trabalho mostrou várias evidências onde a mobilização das reservas das plântulas de cajueiro sob estresse salino é controlada pelo estreito mecanismo fonte-dreno associado à retenção dos produtos de hidrólise nos cotilédones. A investigação de particionamento de carbono e nitrogênio na plântula inteira tanto como o balanço hormonal sob estresse salino poderá elucidar o mecanismo regulatório da mobilização das reservas durante o estabelecimento das plântulas de cajueiro.

3.6 Referências Bibliográficas

ASHRAF M, WAHID S. Time-course changes in organic metabolites and mineral nutrients in germination maize seeds under salt (NaCl) salinity. **Seed Science and Technology**. v.28, p.641-656, 2000.

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

BEWLEY J. D, BLACK M. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. New York: Plenum Press, 1994.

BEWLEY, J. D. Seeds germination and reserve mobilization. In: *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group www.els.net, 2001.

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.248-254, 1976.

BUCHANAN B. B, GRUISSEM W, JONES R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

BUCKERIDGE M. S, AIDAR M. P. M, SANTOS H. P, TINÉ M. A. S. Acúmulo de reservas. In: Ferreira AG, Borghetti F, editors. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p 324, 2004.

BUCKERIDGE M. S, AIDAR M. P. M, SANTOS H. P, TINÉ M. A. S. Acúmulo de reservas. In: Ferreira AG, Borghetti F, editors. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p 48, 2004.

BUCKERIDGE M. S., TINÉ M. A. S., SANTOS H. P., LIMA D. U. Polissacarídeos de reservas de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. V.12, p.137-192, 2000b.

CAVALCANTI JÚNIOR A. T. Morfo-fisiologia da germinação e estabelecimento da plântula de cajueiro anão precoce. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1994.

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

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.248-254. 1956.

FAGERIA, N.K.; GHEYI, H.R. Melhoramento Genético das culturas e seleção de cultivares. **Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura Irrigada**. UFPB/SBEA. Campina Grande, PB, 1997.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein Storage bodies and vacuoles. **The plant cell**, v.11, p.601-613, 1999.

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

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

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

- MITCHELL D, MADORE M. Patterns of assimilate production and translocation in muskmelon (*Cucumis melo* L.) II. **Low temperature effects**. *Plant Physiology* v.99, p.966-971, 1992.
- MUNNS, R. Physiological processes limiting plant growth on saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment*, v.16, p.15-24, 1993.
- NABAIS C, HAGEMEYER J, FREITAS H. Nitrogen transport in the xylem sap of *Quercus ilex*: the role of ornithine. *Journal of Plant Physiology* 2005; 162, 603-606.
- OSBORNE TB. The vegetable proteins. London: Longmans Green and Co., 1924.
- PEOPLES M. B, FAIZAH A. W, REAKASEM B, HERRIDGE D. F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1989.
- PRISCO J. T, ENÉAS-FILHO J, GOMES-FILHO E. Effects of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seeds. *Revista Brasileira de Botânica* v.4, p.63-71, 1981.
- PRISCO J. T, VIEIRA G. H. F. Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination in *Vigna sinensis* seeds. *Physiologia Plantarum* v.36, p.317-320, 1976.
- RAMOLIYA P. J, PANDEY A. N. Effect of increasing salt concentration on emergence, growth and survival of seedlings of *Salvadora oleoides* (Salvadoraceae). *Journal of Arid Environments* v.51, p.121-132, 2002.
- RAMOLIYA P. J, PANDEY A.N. Effect of salinization of soil on emergence, growth and survival of seedlings of *Cordia rothii*. *Forest Ecology and Management* v.176, p.185-194, 2003.
- SILVEIRA J. A. G, MACHADO E. C. Mobilização de nitrogênio e carboidratos durante o desenvolvimento de panículas de duas cultivares de arroz. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* v.2, p.37-46, 1990.
- SILVEIRA J. A. G, VIÉGAS R. A, ROCHA I. M. A, MOREIRA A. C. O. M, MOREIRA R. A, OLIVEIRA J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology* v.160, p.115-123, 2003.
- THAKUR M, SHARMA A. D. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: evidence suggesting a role of proline in seed germination. *Journal of Arid Environments* v.62, p.517-523, 2005.
- WAHID A, JAVED I-H, ALI I, BAIG A, RASUL E. Short term incubation of sorghum caryopses in sodium chloride levels: changes in some pre- and post-germination physiological parameters. *Plant Science* v.139: p.223-232, 1998.

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

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

Caracterização de proteases envolvidas na mobilização das reservas protéicas em plântulas de cajueiro na presença de NaCl

4.1 Introdução

As proteínas de reservas localizados nos cotilédones de plantas dicotiledôneas são hidrolisadas e seus constituintes translocados para a plântula em desenvolvimento. A degradação e mobilização das proteínas de reservas requerem a ação combinada de enzimas proteolíticas que podem estar presente nas sementes maduras ou sintetizadas *de novo* durante a germinação e o desenvolvimento da plântula. Por tanto, as enzimas proteolíticas têm sido reconhecidas como componente chave durante a mobilização das reservas de proteínas, sendo necessário um conhecimento mais específico dessas enzimas durante o desenvolvimento do embrião para melhor entendimento do processo (Müntz, K. 2001).

Existe um tipo de vacúolo que acumulam proteínas produzidas ao longo do desenvolvimento da semente. São os vacúolos líticos que contém enzimas proteolíticas ácidas (hidrolases ácidas), cuja função é hidrolisar proteínas para o crescimento na fase pós-germinativa, suportando o desenvolvimento inicial da plântula (Müntz, K. 2001).

A hidrólise das proteínas de reserva aos seus peptídeos e aminoácidos constituintes é realizada por proteases classificadas de acordo com sua atividade hidrolítica (endopeptidases, aminopeptidases e carboxipeptidases). Em sementes de cereais o endosperma é o principal local de acúmulo de proteínas, e a síntese de proteinases ocorre principalmente na camada de aleurona. Os aminoácidos resultantes da hidrólise dos oligopeptídeos por peptidases são convertidos no citoplasma a amidas (glutamina e asparagina) e então transportados para o eixo em crescimento. Em sementes de dicotiledôneas, os cotilédones são os principais órgãos de reserva e a hidrólise enzimática das proteínas inicia-se nos corpos protéicos onde posteriormente as amidas são transportadas para o eixo em crescimento. Com o fim da proteólise, os corpos protéicos vazios são fundidos formando grandes vacúolos, onde uma variedade de hidrolases é secretada, transformando em vesículas autofágicas responsáveis pela senescência e degeneração dos cotilédones (Shewry e Casey, 1999).

As endopeptidases são classificadas de acordo com seu mecanismo catalítico, relacionado diretamente a especificidade no sítio ativo dessas enzimas. A expressão proteinase é usada como um sinônimo das endopeptidases as quais

estão relacionadas geralmente com a germinação e desenvolvimento do embrião. Em plantas, principalmente nas sementes, as endopeptidases têm sido chamadas de proteinases. Estas são agrupadas em quatro classes: proteinase cisteínicas, serínicas, aspárticas e metalo-proteinase. Na prática, proteinases são divididas nestes grupos de acordo com suas seqüências homólogas e uso de inibidores classe-específica. Alguns desses inibidores são resumidamente discutidos abaixo (Barrett,1994).

As proteinases serínicas são enzimas que abriga no seu sítio catalítico um grupo serina ativo. Estas enzimas são envolvidas em uma variedade de processo fisiológico como senescência, morte programada celular, xilogêneses, diferenciação de tecidos, infecção das células de plantas e germinação. A classificação de uma proteinase em classe de proteinase serínica é geralmente realizada pelo uso do fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) ou di-isopropil fluorofosfato. Duas proteinases serínicas familiar são as enzimas digestivas de mamíferos: quimiotripsina e tripsina. (Palma *et al.* 2002).

As proteinases cisteínicas são as endopeptidases mais conhecidas, sendo a papaína da Papaia a mais estudada. O mecanismo catalítico dessas enzimas envolve um grupo cisteína no sítio ativo que interage com o substrato protéico. Estas enzimas são envolvidas em eventos biológicos como a senescência, diferenciação de células do mesófilo em elementos traqueóides, xilogênese, morte celular programada ligado a patógeno e mobilização de proteínas durante a germinação. As endopeptidases asparaginil estão incluídas na classe das proteinases cisteínicas, estando envolvidas principalmente na mobilização de proteínas de reservas durante a germinação de várias sementes (Palma *et al.* 2002). Dos inibidores de proteinases cisteínicas o trans-epoxissuccinil-L-leucilamida 4-guanidino butano (E-64) e a Leupepitina são os mais usados, sendo este último de baixa especificidade inibindo apenas algumas proteinases cisteínas.

As proteinases aspárticas possuem afinidade por ligações peptídicas flanqueadas por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, e são ativas em pH ácido. Entretanto, enzimas aspárticas têm sido relatadas em uma ampla faixa de espécies de plantas, a maior parte dos estudos foi conduzida em grãos de cevada, aonde são abundantes. Existe menos estudo com proteinase aspárticas quando comparado com as proteinases cisteínicas e serínicas, portanto, poucas funções biológicas são atribuídas para estas proteinases. Das funções biológicas identificadas estão: a

degradação de proteínas relacionadas à patogênese extracelular e proteólise das proteínas de reservas globulares de sementes de cacau e momona. A pepsina, uma proteinase aspártica, inicia a digestão das proteínas em condições ácidas do estômago. O inibidor mais usado para inibir proteinase aspárticas é a pepstatina isovarelil de origem microbiana (Palma *et al.* 2002).

De todas as proteinases a menos conhecidas são as metalo-proteinases. A maior parte destas enzimas contém zinco, embora cobalto e manganês possam também estar presentes. Estes íons ativam a molécula d'água necessária para hidrólises das ligações peptídicas. Metalo-proteinases da matriz incluem um número de endopeptidases animais envolvido na degradação das proteínas da matriz extracelular. Resultados obtidos em animais sugerem que estas enzimas nas plantas podem ser um importante regulador do crescimento e desenvolvimento e poderá participar da morte programada celular (Palma *et al.* 2002). Os inibidores mais usados são 1,10-phenanthroline e 3,4-dichloroisocoumarin, entretanto o EDTA é comumente usado. (Barrett 1986, Barrett 1994, Ryan and Walker-Simmons 1981).

O objetivo do presente trabalho foi estudar o comportamento temporal da atividade proteolítica e o perfil das proteínas em cotilédones de plântulas de cajueiro sob tratamento salino com NaCl.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Extração de proteínas solúveis de cotilédones de cajueiro

Amostras com 1 g de massa fresca de cotilédones foram maceradas com nitrogênio líquido e extraídas com 5 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 contendo EDTA 2 mM, ditioneitol 2 mM e PEG 6000 3% (m/v). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C. As proteínas solúveis destes extratos foram quantificadas de acordo com o método de Bradford (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

4.2.2 Atividade *in vitro* das proteases

Para medir a atividade das proteinases, alíquotas de 50 μL de extrato foram adicionadas a 1,0 mL de tampão de atividade contendo: acetato 50 mM pH 5,0, L-cisteína 5 mM, Triton X-100 0,1% (v/v) e azocaseína 1% (v/v). As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h e a reação inibida pela adição de 150 μL de TCA 0,2 M. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 6.500 $\times g$ por 5 min, coletando-se 1,2 mL do sobrenadante. A atividade enzimática foi detectada no espectrofotômetro Thermus Spectronic Genesys a 440 nm, comparando as leituras obtidas a um controle com proteases sem atividade biológica, devido desnaturação prévia com TCA 0,2 M. A atividade foi expressa em UA mg^{-1} Proteína h^{-1} , considerando 1 unidade de atividade (UA), como 0,01 unidade de absorbância (Ainouz e Freitas, 1991).

Para a inibição da atividade de proteinases serínicas, cisteínicas, metalo e aspárticas, foram utilizados os inibidores **fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF)**, **trans-epoxissuccinil-L-leucilamida (4-guanidino) butano (E-64)**, **ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)** e **pepstatina**, respectivamente. Para tanto, alíquotas 50 μL do extrato foram pré-incubados com PMSF 1 mM, E-64 10 μM , EDTA 2 mM ou pepstatina 100 μM , por 30 minutos a 25 °C, antes do ensaio de atividade. (Domique, 1993).

4.2.3 Zimograma PAGE-Nativo unidimensional

Para avaliação da atividade de possíveis isoformas de proteinases foram realizados zimogramas de amostras de cotilédones. Para tanto, 20 μL da amostra diluída 10x foi misturada ao tampão Tris-HCl 0,062 M pH 6,8 contendo glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (v/v), sendo submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 12,5% (v/v) contendo gelatina 0,1% (v/v), na ausência de SDS e β -mercaptoetanol. A corrida eletroforética foi conduzida a 20 mA e 4°C por 2 h. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado em Triton X-100 2,5% (v/v) por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi transferido para tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 contendo L-cisteína 10 mM e Triton X-100 0,2% (v/v) e incubado por 12 h a 37°C. Após a incubação, o gel foi revelado com azul brilhante de Coomassie R-250 0,1% (v/v), metanol 41,6% (v/v) e ácido acético 16,6% (v/v)

durante 12 h e lavado com metanol: ácido acético: água (3:1:6 v/v/v). As bandas que apresentarem atividade foram comparadas com as bandas obtidas em gel sem o substrato e corado com azul brilhante de Coomassie R-250 0,1% (v/v), metanol 41,6% (v/v) e ácido acético 16,6% (v/v) (Dominique, 1993).

4.2.4 Eletroforese PAGE-SDS unidimensional

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS) e de β - mercaptoetanol, foi conduzida seguindo-se a técnica descrita por Laemmli (1970). O gel de aplicação contendo 5% de poliacrilamida foi preparado com tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS a 10% (m/v), persulfato de amônio 15% e 5 μ L TEMED. O gel de separação com 12,5% (m/v) de poliacrilamida foi preparado com tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8, contendo SDS a 10% (m/v), persulfato de amônio 15% e 5 μ L TEMED. Amostras de 20 μ L diluída 20x dos extratos de cotilédones a serem submetidas à eletroforese foram misturadas com tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo 2% de SDS, glicerol 10% e mercaptoetanol 5% (v/v) e aplicadas nos géis. A corrida eletroforética foi realizada à amperagem constante (20 mA), com duração média de 2 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado para corar por aproximadamente 12 h em azul brilhante de Coomassie R-250 0,1% (v/v), metanol 41,6% (v/v) e ácido acético 16,6% (v/v). O descoramento foi realizado numa mistura de metanol: ácido acético: água (3:1:6 v/v/v). Albumina sérica bovina (66 KDa); albumina de ovo (45 KDa); Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36 KDa); Tripsinogênio de pâncreas bovino (24 KDa); Inibidor de tripsina de soja (20 KDa) e α -Lactalbumina de leite bovino (14,2 KDa) foram usados como marcadores de massa molecular (Sigma).

4.2.5 Extração e precipitação de proteínas totais de cotilédones de cajueiro

50mg da matéria fresca do tecido cotiledonar, liofilizado e moído, foram misturados com PVP insolúvel e tampão de extração (pirimidina 50 mM, tioreia 10 mM, SDS 1%, pH 5.0) na proporção 1:2:40 (p/p/v), a mistura foi agitada por duas horas a 4°C e centrifugada a 10.000 xg por 40 minutos. O sobrenadante foi removido e misturado com TCA 10% em acetona gelada durante 2 horas a -20°C depois

centrifugado a 10.000 xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com acetona gelada, agitando fortemente até obter uma suspensão uniforme. A suspensão foi centrifugada a 5.000 xg por 5 minutos a 4C° (sobrenadante é descartado e o precipitado é submetido ao mesmo tratamento assim que nenhum resíduo de TCA for encontrado). Em seguida, o precipitado foi secado a vácuo e a quantidade de proteína é medida pelo método de Bradford, pesando uma fração do pó e dissolvendo em ureia 8M (Campos *et al*, 2005).

Para focalização isoeétrica, amostras protéicas precipitadas e dissolvidas em tampão Uréia 8M, foram diluídas 20x, e 80µL do diluído foram misturadas com 120µL do tampão de reidratação.

4.2.6 Eletroforese PAGE- SDS Bidimensional (2-D)

Proteínas totais foram analisadas através de eletroforese PAGE-SDS em duas dimensões (2-D). Para a primeira dimensão, a focalização isoeétrica foi realizada usando tiras de géis com um gradiente imobilizado de pH linear de três a dez (3-10). As tiras de géis foram reidratadas por 12 horas com o tampão de hidratação (Dithiothreitol 25mM, Uréia 7M, Tioréia 2M, Glicerol 10%, Chaps 2%, Anfólitos 2% e Azul de bromofenol). Focalização isoeétrica foi realizada a 20 °C em um sistema IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech) com aumento sucessivo em voltagem: 100 V por 1 hora, 200 V por 1 hora, 5000 V por 2 hora, 8000 V por 1 hora até a voltagem total aplicada de 20000V. Após a focalização isoeétrica, as tiras de géis foram equilibradas em uma solução desnaturante redutora (Tris-HCl 50mM pH 8,8 com Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, Dithiotheitol e azul de bromofenol), e depois as proteínas focalizadas foram separadas em eletroforese gel de poliacrilamida a 12 % (w/v), que foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970). Após eletroforese, as proteínas em gel foram visualizadas por coramento com Comassie blue.

Para realização do zimograma bidimensional (2-D) foram usadas às mesmas condições da PAGE-SDS (2-D) excluindo o SDS e acrescentando gelatina 0,1% como substrato enzimático (figura 4b).

4.3 Resultados

A atividade azocaseinolítica das proteases cotiledonares das plântulas de cajueiro permaneceu igual e constante, tanto no tratamento salino como no tratamento controle até o 12º dia após o semeio. Após esse período a atividade no tratamento salino permaneceu a mesma, e somente no 24º dia foi observado um aumento de até 5x. Já o tratamento controle dobrou a atividade do 16º ao 20º chegando ao 24º dia com atividade 8x maior (figura 1a).

O conteúdo de proteínas solúveis dos cotilédones nos dois tratamentos teve um decréscimo contínuo durante a mobilização, possuindo na última coleta, do tratamento controle, um conteúdo de proteína 7x menor que o da coleta inicial (figura 1b).

Analisando os gráficos com os inibidores específicos de proteínase, o inibidor de proteínase serínica (PMSF) apresentou maior resposta de inibição (figura 1f) comparado com os demais inibidores (figura 1c, d, e) nas proteases de cotilédones, tanto do tratamento controle como salino. O inibidor com menor resposta foi o EDTA (figura 1e), já os inibidores E-64 e pepstatina inibiram moderadamente e de intensidade iguais as proteinases dos cotilédones nos tratamentos controle e salino (figura 1c, d).

Atividade enzimática (gelatinolítica), tempo dependente, da extração cotiledonar das plântulas de cajueiro, também foi analisada através de zimograma (figura 2). A revelação do gel, depois de incubado a 37°C, mostrou um aumento da atividade enzimática com o passar do tempo nos cotilédones sob tratamento controle, nos cotilédones sob tratamento salino (NaCl 50 mM) existe revelação da atividade enzimática somente no extrato da última coleta (24º dia). Ainda no zimograma é observado, no gel controle, a formação de uma segunda banda quando aplicado extrato cotiledonar do tratamento controle do 24º dia de coleta. O gel incubado com solução contendo o inibidor PMSF não formou bandas de atividade gelatinolítica, já o gel incubado com EDTA apresentou revelação semelhante ao do gel controle. Os géis incubados com E-64 e pepstatina não tiveram revelação da banda superior, surgindo somente a banda inferior (figura 2).

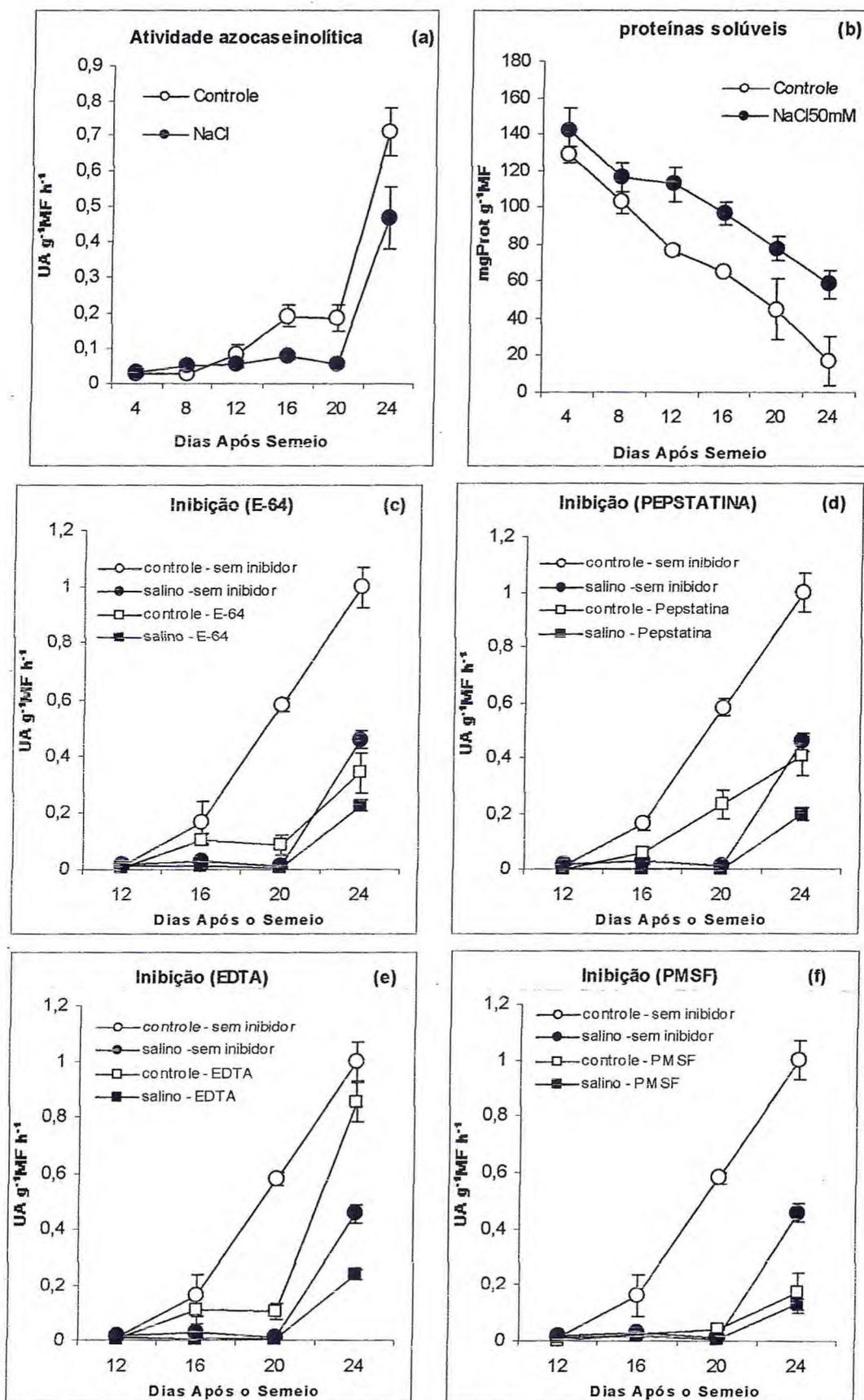


Figura 1. Atividade azocaseinolítica *in vitro* total (a), proteínas solúveis totais (b) e resposta inibitória *in vitro* dos inibidores de proteinase específicos (c, d, e, f) de cotilédono das plântulas de cajueiro sob tratamento controle e salino.

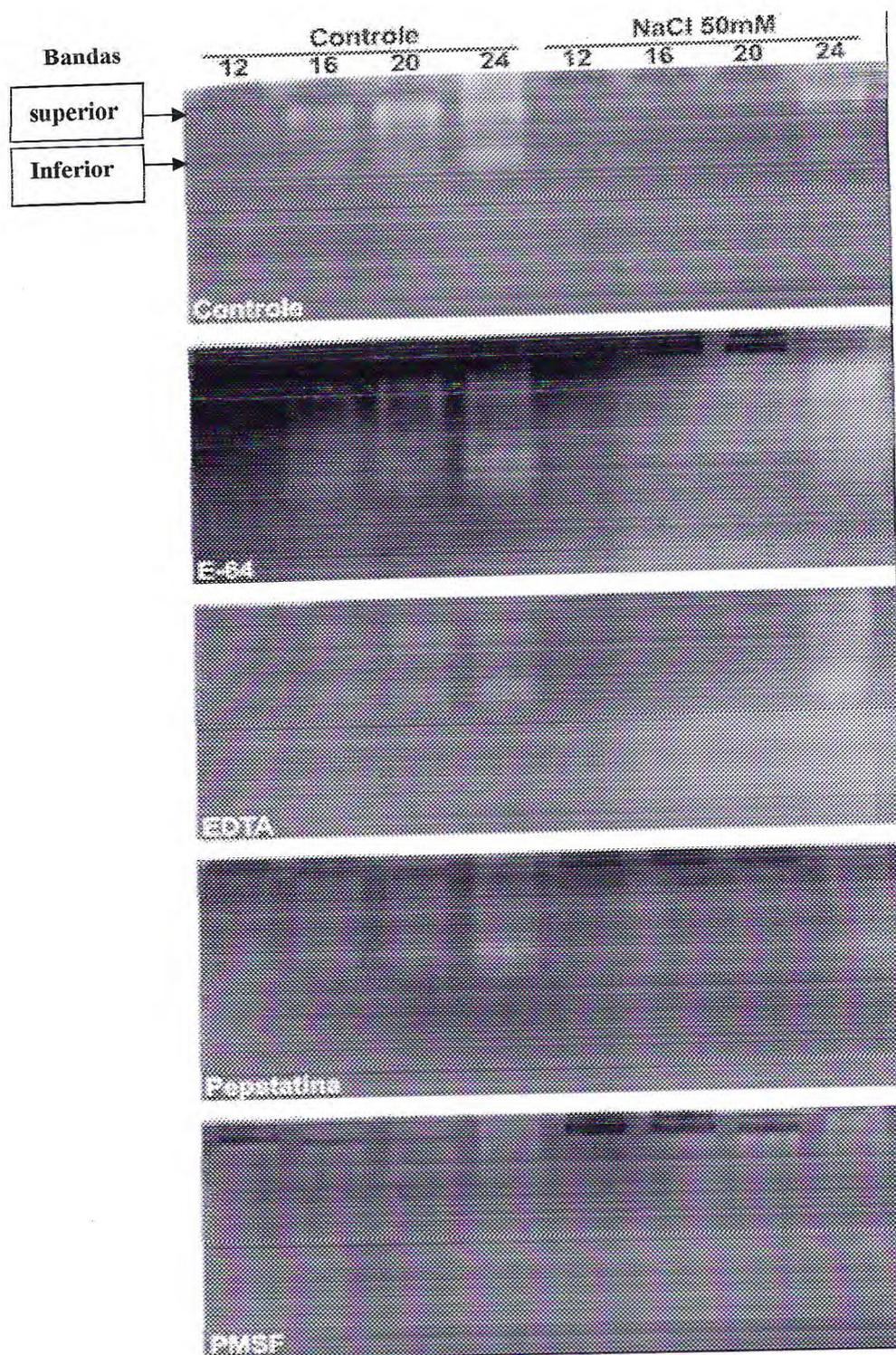


Figura 2. Atividade gelatinolítica em PAGE-nativo das proteases cotiledonares das plântulas de cajueiro sob tratamento controle e salino, em gel (zimograma) incubado com diferentes inibidores de proteinases (E-64, EDTA, Pepstatina e PMSF).

Perfil eletroforético PAGE-SDS de proteínas solúveis, dos cotilédones de cajueiro, mostra três bandas (1, 2, 3) coradas com *comassie blue* que se destacam e se mantêm até o 12° dia no tratamento controle e até o 16° dia no tratamento salino. A terceira banda é a única que permanece até 24° dia no tratamento salino (bastante fraca), onde no tratamento controle ela desaparece ao 20° dia. As massas das bandas 1, 2, 3 são respectivamente próximas de 55, 34 e 22kDa (figura 3).

Perfil eletroforético PAGE- SDS em duas dimensões (2-D) de proteínas totais, com tiras de focalização isoelétrica variando de 3 a 10 e marcadores de 14 a 97 kDa. Os pontos corados com *comassie blue* (*spots*) indicam proteínas com massa e ponto isoelétrico (**pI**) específicos, distribuídos uniformemente por todo gel, designando uma variedade de espécies de proteínas e enzimas encontradas em cotilédones de sementes de cajueiro 12 dias semeadas sob tratamento salino (figura 4a, 6a).

Através do programa da Amersham Biosciences (ImageMaster™ 2D Plantinum Software Version 5.0) massa e ponto isoelétrico dos *spots* foram analisados, e através do programa disponível na internet (**ExpASY-TagIdent**) foi possível fazer análise parcial dos *spots* no gel PAGE-SDS (2-D), de proteínas totais de cotilédone de cajueiro, com finalidade de comparar com *spots* de outras espécies de plantas já identificadas. Foram analisados *spots* com massa próxima de 52kDa-pI (7.1 a 7.5), 33kDa-pI (7.0 a 7.5), 31kDa-pI (6.3 a 6.9) e 22kDa-pI (4.4 a 5.3), sendo identificado precursores de protease serínicas, Albuminas, glutelinas e globulinas respectivamente (figura 4a)

Zimograma 2-D das proteínas solúveis de cotilédone de cajueiro, após 24 dias de semeio sob tratamento controle, mostrando atividade gelatinolítica de proteases responsáveis pela hidrólise das proteínas de reservas. Os três pontos de revelação observados no gel estão localizados numa região com massa e pI superior a 66kDa e 8 respectivamente (figura 4b).

PAGE-SDS em duas dimensões com tiras de focalização isoelétrica variando de 3 a 10 e marcadores de 14 a 97kDa foram realizadas com extratos de cotilédones com 12, 16, 20 e 24 dias após o semeio sob tratamento controle e salino (figura 6). O volume e intensidade dos *spots* diminuem com o passar do tempo, e após 24 dias ainda é possível identificar *spots* no gel com extrato de cotilédones sob tratamento controle (figura 6d).

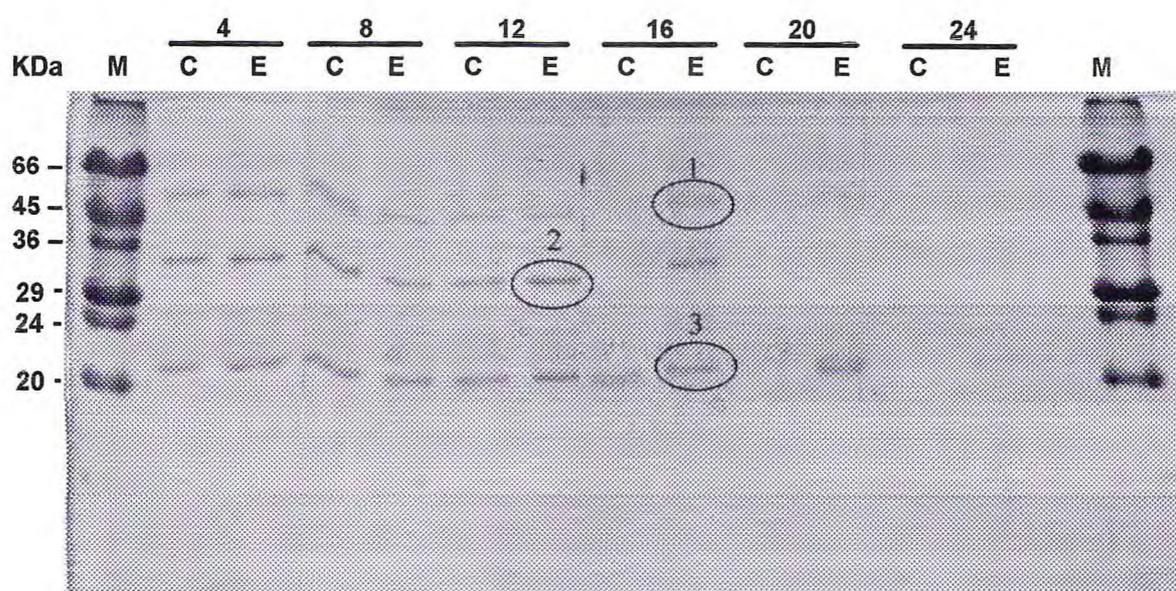


Figura 3. Perfil eletroforético PAGE-SDS de proteínas cotiledonares das plântulas de cajueiro sob tratamento controle (C) e sob estresse salino (E) aos 4, 8, 12, 16, 20 e 24 dias após a sementeira.

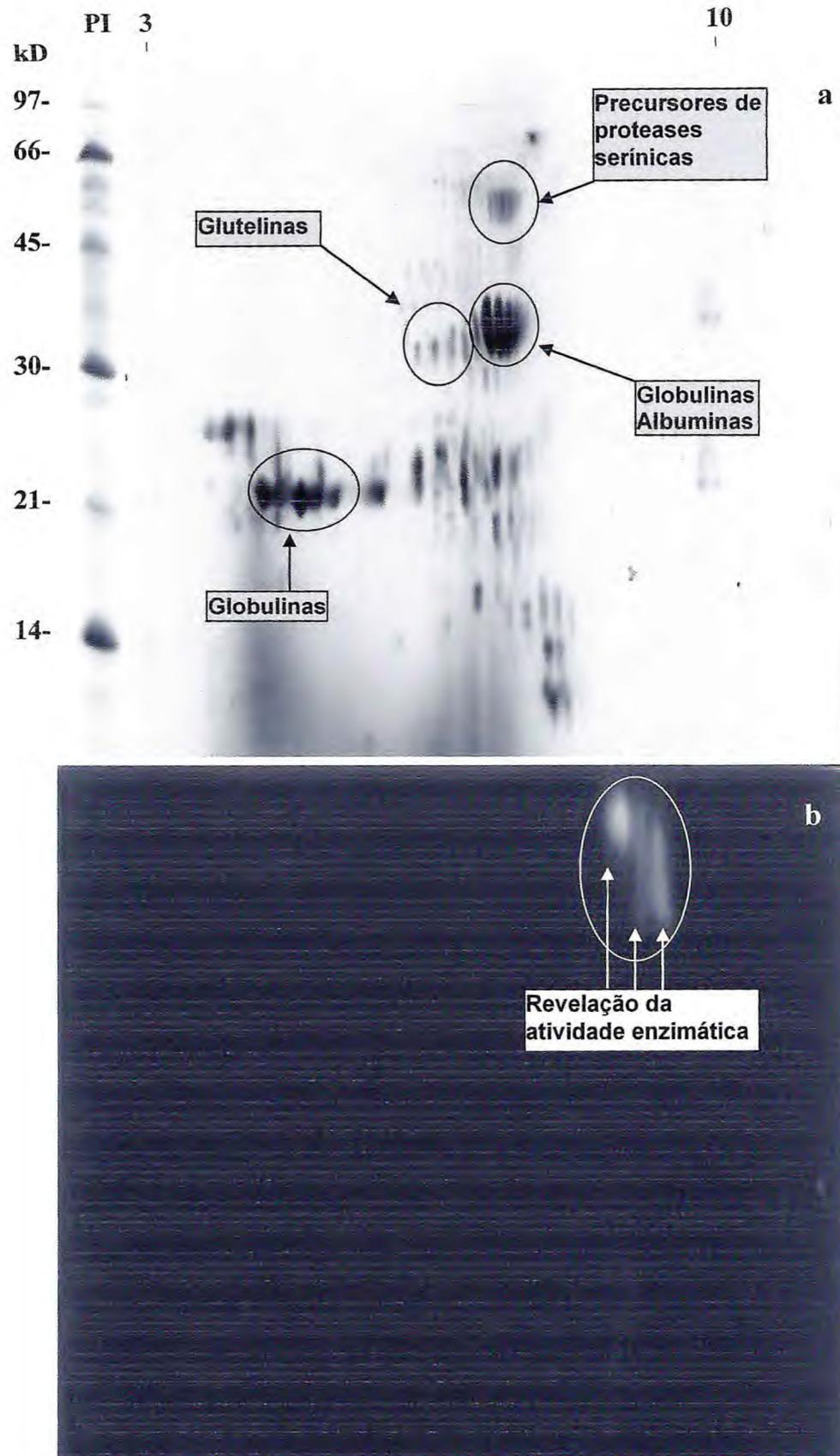


Figura 4. Eletroforese PAGE-SDS (2-D) das proteínas totais de cotilédones de plântulas de cajueiro 12 dias após o semeio sob o tratamento salino (a). Zimograma 2-D das proteínas solúveis de cotilédones de plântula de cajueiro 24 dias após o semeio sob tratamento controle.

***Arabidopsis thaliana* (O82229)**

Putative serine carboxypeptidase-like 23 precursor (EC 3.4.16.-).

pI: 7.27, MW: 49230.73

***Arabidopsis thaliana* (Q9LEY1)**

Serine carboxypeptidase-like 35 precursor (EC 3.4.16.-).

pI: 7.27, MW: 51455.26

***Arabidopsis thaliana* (Q84WF0)**

Serine carboxypeptidase-like 37 precursor (EC 3.4.16.-).

pI: 7.27, MW: 51720.80

***Arabidopsis thaliana* (Q9FH06)**

Serine carboxypeptidase-like 41 precursor (EC 3.4.16.-).

pI: 7.28, MW: 50378.32

***Arabidopsis thaliana* (Q9FFB0)**

Serine carboxypeptidase-like 47 precursor (EC 3.4.16.-).

pI: 7.17, MW: 53899.27

***Triticum aestivum* Glutenin, low molecular weight subunit PTDUCD1 precursor. (P16315)**

pI: 6.87, MW: 31272.52 pI = 6.8 Mw = 31000 delta-pI = 0.50 delta-Mw = 310

***Brassica Napus* Cruciferin alpha chain. (P33525)- globulinas 11 S**

pI: 7.17, MW: 32938.47

Figura 5. Ponto isoelétrico e massa de precursores das proteases serínicas, subunidade glutelínica e cadeia alfa da globulina de diferentes espécies de plantas.

Fonte: <http://www.expasy.org/cgi-bin/tagident0.pl>

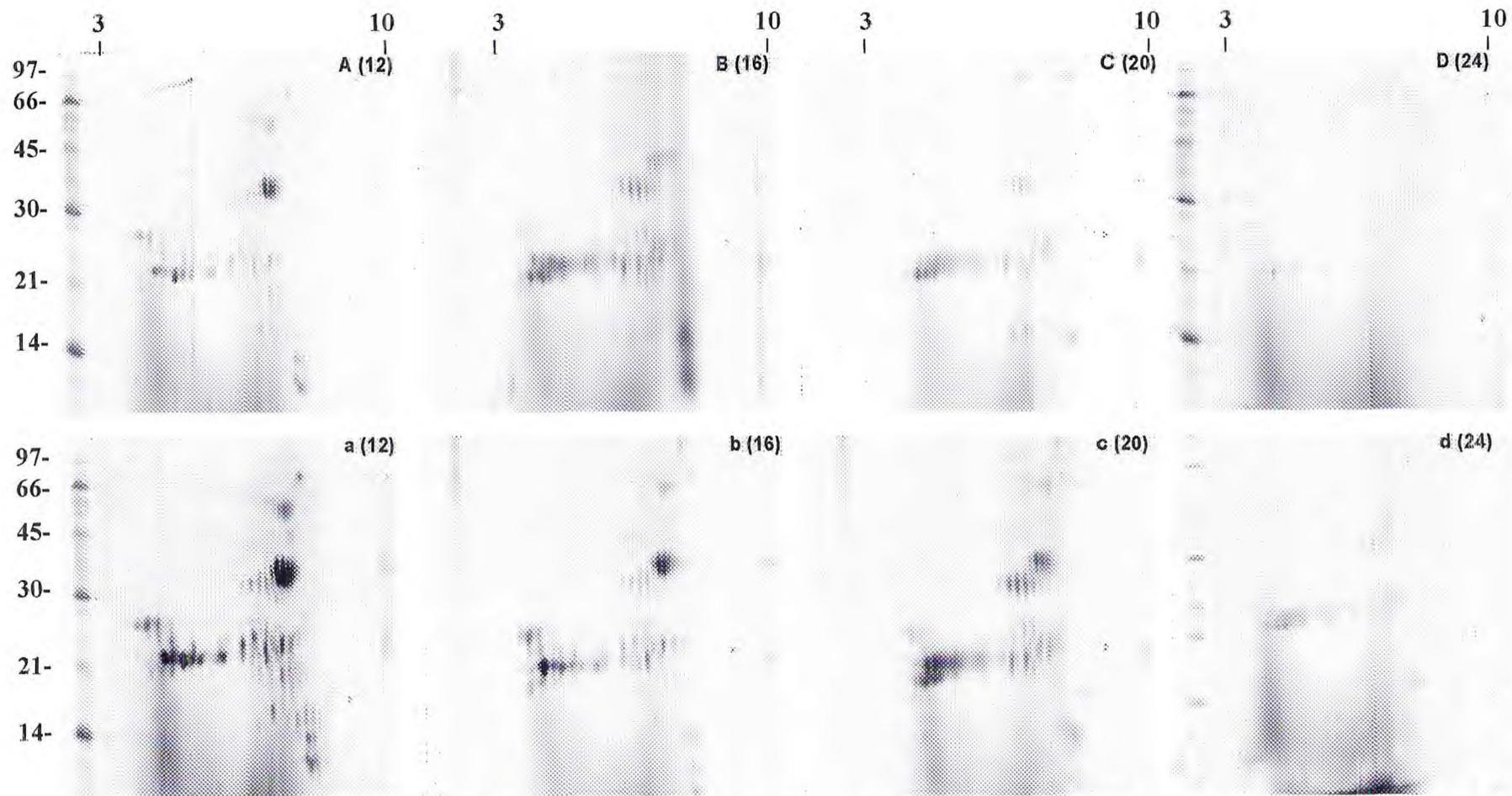


Figura 6. Perfil eletroforético PAGE-SDS (2-D) de proteínas totais cotiledonares das plântulas de cajueiro sob tratamento controle (A, B, C, D) e sob tratamento salino (a, b, c, d) aos 12, 16, 20 e 24 dias após a sementeira (tempo dependente).

4.4. Discussão

Durante a germinação, período que antecede o 12º dia, a atividade azocaseinolítica *in vitro* dos extratos cotiledonares das plântulas submetidas aos tratamentos controle e salino não é alterado, e somente no 24º dia existe um aumento de cinco unidades de atividades por grama de massa fresca por hora ($UA\ g^{-1}MF\ h^{-1}$) no tratamento salino. Já no tratamento controle é observado a partir do 12º dia um pequeno aumento que se mantém até o 20º dia, seguido por um aumento significativo na última coleta (24º dia). Nos extratos de cotilédones das plântulas sob tratamento salino houve um atraso de até duas $UA\ g^{-1}MF\ h^{-1}$ comparado com o controle (figura 1a), esses resultados podem confirmar o atraso de até 30% do conteúdo de proteínas solúveis durante a mobilização (figura 1b).

As análises da atividade das proteinases, incubada com inibidores específicos, foram realizadas a partir do 12º dia de semeio (figura 1c, d, e, f) nos dois tratamentos, isso devido ao aumento da atividade azocaseinolítica *in vitro* nos extratos cotiledonares do tratamento controle a partir desse dia. Notadamente as inibições específicas foram comparadas com as amostras sem inibição, tanto no tratamento controle como no tratamento salino, observando-se novamente uma nítida diferença entre os tratamentos, existindo atraso na atividade azocaseinolítica dos cotilédones das plântulas sob tratamento salino (figura 1c, d, e, f).

Analisando os gráficos de inibição proteinase específica da **figura 1**, e comparando com a atividade total (sem inibidor), as metaloproteinases são as proteinases em menor quantidade nos cotilédones de cajueiro devido existir uma menor diferença na inibição específica com EDTA quando comparada com o comportamento da atividade sem inibidor (figura 1e).

As proteinases cisteínicas e aspárticas são inibidas pelo E-64 e a pepstatina respectivamente, como a inibição dessas proteinases foi parcial, tanto para o tratamento controle como salino, possivelmente proteinases cisteínicas e aspárticas são responsáveis pela mobilização de reservas protéicas em cotilédones de cajueiro.

O PMSF, inibidor de proteinase serínica, teve maior resposta inibitória comparada com os demais inibidores, onde foi observada uma diferença de $0,8\ UA\ g^{-1}MF\ h^{-1}$ no tratamento controle, ou seja, 80% de inibição da atividade total (figura 1 f). Isso leva a concluir, que as proteinases serínicas são as enzimas de maior atividade hidrolítica das proteínas de reservas dos cotilédones de cajueiro.

É importante ressaltar a ratificação observada na atividade azocaseinolítica *in vitro* e atividade gelatinolítica em gel (figura 2), pois o pico máximo de atividade *in vitro* coincide com uma revelação mais intensa no gel tanto no tratamento controle como no salino. Os extratos de cotilédones nos três primeiros tempos de coleta, sob tratamento salino não mostrou atividade *in vitro* significativa, portanto não existiu revelação gelatinolítica no gel controle nesses mesmos tempos (figura 2- 12d, 16d, 20d).

Globulinas são as principais proteínas de reserva em sementes de dicotiledôneas, especialmente as leguminosas. As prolaminas e glutelinas são as proteínas de reserva mais comuns em sementes de monocotiledôneas, como os cereais. Já as albuminas são mais amplamente distribuídas, ou seja, são encontradas tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas (Bewley e Black, 1994)

Anacardium occidentale é uma espécie de dicotiledônea que possui, no início da germinação, 96% da reserva protéica do tipo globulinas. Essas proteínas são mobilizadas dos cotilédones durante o estabelecimento de plântula de cajueiro, e após 28 dias do semeio, apenas 4% das globulinas é ainda encontrada. Nos estádios finais de mobilização das reservas 91% das reservas protéicas ainda existente são albuminas, seguida das prolaminas com 5% (Almeida, 2003).

No 24° dia a banda inferior no zimograma controle, de extrato cotiledonar do tratamento sem NaCl, se intensifica (figura 2- 24d). Possivelmente essa banda corresponde a um aumento da síntese de proteinases do tipo serínicas que são responsáveis pela hidrólise tardia das reservas protéicas do tipo albumina e/ou prolamina (capítulo 3- figura 3).

Do 20° ao 24° dia, o aumento da atividade azocaseinolítica *in vitro* de 0,2 para 0,5 UA g⁻¹MF h⁻¹ (figura 1a) pode estar relacionado a aumento da expressão de uma isoforma de proteinase serínica responsável pela mobilização de reservas albumínicas e prolamínicas ainda existente (capítulo 3- figura 3). Essa conclusão pode ser corroborada, devido o aumento da intensidade da banda inferior no zimograma, pois ela se mantém ao ser usado inibidores de proteinases cisteínas e aspárticas (figura 2- E-64, pepstatina) e desaparece ao ser usado inibidor de proteinases serínicas (figura 2- PMSF). Logo a banda superior do zimograma pode estar relacionada à atividade de proteinases cisteínicas, aspárticas e serínicas com

massas bastante próximas, pois sua revelação desaparece ao ser usado seus respectivos inibidores (figura 2- E-64, pepstatina, PMSF).

Atividade gelatinolítica das metaloproteinases não é observada, isso devido ao fato das duas bandas de revelação se manterem acesa quando o inibidor EDTA foi utilizado (figura 2- EDTA).

A análise dos *spots* da PAGE-SDS (2-D) quando comparados com *spots* de outras espécies no banco de dados proteômico **ExpASy** demonstrou que os *spots* com massa próximo de 52kDa e pI (7.1 a 7.5) possui massa e pI parecido com dos precursores de proteases serínicas (figura 5); *spots* com massa próximo de 33kDa e pI (7.0 a 7.5) possui massa e pI parecido com o da cadeia alfa da globulinas 11S de *Brassica Napus*, e de albuminas (figura 5); *spots* com massa próximo 31kDa e pI (6.3 a 6.9) possui massa e pI parecido com o da subunidade glutelina de *Triticum aestivum* (figura 5); *spots* com massa próximo de 22kDa e pI (4.4 a 5.3) possui massa e pI parecido com o da esporamina, uma globulina de *I. batata* (Hattori *et al.*, 1990).

Na PAGE-SDS a banda 1 (55kDa), 2 (34kDa) e 3 (22KDa) possui massa próxima dos precursores de proteases serínicas, albuminas e globulinas do tipo esporamina respectivamente (figura 4a). A banda que correspondente à globulina (banda 3) permanece corada até 24 dias de semeio em amostras de cotilédones sob tratamento salino (figura 3). Esse resultado é reforçado pela PAGE-SDS (2-D), onde é observado *spots* com menos intensidade de coramento na área do gel próxima de 22kDa (figura 6d), indicando que ainda existem proteínas de reservas a serem mobilizadas do tipo globulina. Em *I. batatas*, cerca de 60 a 80 % do total de proteínas solúveis é representado por uma proteína de reserva, da classe das globulinas, a esporamina. As duas formas monoméricas, dessa proteína, de pesos moleculares em torno de 25Kd, foram denominadas de esporamina A e esporamina B (Hattori *et al.*, 1990).

Zimograma 2-D possui três revelações na parte superior do gel, com ponto isoelétrico em torno de 8 e massa superior a 66 kDa, estas revelações podem indicar atividade das isoformas de um mesmo tipo de proteinase ou de proteinases distintas, com pontos de focalização isoelétrica próximos e massa semelhantes (figura 4b). Zimograma 2-D também foi realizado com amostras de cotilédones de cajueiro com 20 dias após o semeio sob tratamento controle, mas os pontos de revelação são menos intensos (resultado não mostrado) quando comparado com a revelação das

amostras aos 24 dias, corroborando com o aumento da atividade observado em zimograma unidimensional (figura 3 controle). O aumento da atividade observado nos zimogramas pode estar relacionado ao aumento da expressão de proteases tardias necessárias para o esgotamento das proteínas de reservas nos últimos dias do estabelecimento das plântulas, já que um aumento de 300% da atividade azocaseinolítica foi bastante significativo (figura 1a). Somado a isso, existe uma diminuição natural das proteínas de reservas do tecido cotiledonar usado para extração, portanto, enzimas constitutivas da germinação poderão hidrolisar com mais intensidade o substrato do gel (gelatina 0,1%) diminuindo a competitividade com o substrato natural.

4.5 Conclusão

A principal proteína de reserva encontrada nos cotilédones de plântulas de cajueiro foi do tipo globulina, com massa próximo de 22kDa e ponto de focalização isoelétrica entre 4.4 e 5.3.

A principal atividade proteinásica responsável pela mobilização das reservas protéicas é do tipo serínica, existindo também atividade cisteínica e aspárticas.

Existe um atraso da atividade enzimática e da mobilização das proteínas cotiledonares sob tratamento salino, ocasionado possivelmente pela menor força de dreno do eixo em crescimento quando comparado com o tratamento controle.

4.6 Referência Bibliográfica

ALMEIDA, T.D. Mobilização de reservas cotiledonares para folhas de plântulas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino. **Monografia Apresentada na Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza. 2003.

MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; Tiedemann, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**. vol. 52(362), p. 1742-1752, 2001.

SHEWRY, P.R. e CASEY, R. Seed proteins. **Dordrecht: Kluwer Press**, p.883 ISBN 0412815702., 1999

BARRETT, A.J. The classes of proteolytic enzymes. In: **Plant proteolytic enzymes**. Dalling, M.J. ed. Vol. 1, CRC Press Inc. Boca Raton, FL, USA. 1986.

BARRETT, A.J. Classification of peptidases. In: **Methods Enzymol**. Vol. 244. Barrett, A.J. ed. Academic Press. San Diego, CA. USA. 1994.

PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTOS, M. C.; MCCARTHY I. E DEL RÍO, L.A. Plant protease, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 40, p.521-530, 2002.

RYAN, C.A. AND WALKER-SIMMONS, M. Plant proteinases. In: Marcus, A. ed. **The Biochemistry of Plants**. Academic Press Inc.Vol. 6, 1981.

AINOUZ, I. L.; FREITAS, A. L. P. Proteolytic activity in cotyledons of *vigna unguiculata* (L.) walp using azoalbumins e azoglobulins as substrates. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 3(1), p.1-6, 1991.

DOMINIQUE, M.; LOÏC, F.; SERGE, Y. N. Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinaes using-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. **Electrophoresis**. V. 14, p.94-98, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 411, p. 680-685, 1970.

SATHE, S. K. Solubilization and electrophoretic characterization of cashew nut (*Anacardium occidentale*) proteins. **FoodChemistry**. V.51 (3), p.319-324, 1994.

HATTORI, T.; NAKAGAWA, T.; NAKAMURA, K. High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. **Plant Molecular Biology**, Dordrechst, v.14, n.3, p.595-604, 1990.