

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-FITOTECNIA**

**CONTRIBUIÇÃO DE SOLUTOS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS  
NO POTENCIAL OSMÓTICO DE FOLHAS DE *ATRIPLEX*  
*NUMMULARIA* SUBMETIDAS AO NaCl, SECA E PEG**

**JEAN CARLOS DE ARAÚJO BRILHANTE**

**FORTALEZA  
CEARÁ-BRASIL**

**2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-FITOTECNIA**

**CONTRIBUIÇÃO DE SOLUTOS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS  
NO POTENCIAL OSMÓTICO DE FOLHAS DE *ATRIPLEX*  
*NUMMULARIA* SUBMETIDAS AO NaCl, SECA E PEG**

**JEAN CARLOS DE ARAÚJO BRILHANTE**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia-Fitotecnia, área de concentração Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

Orientador

Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. da  
Silveira

**FORTALEZA  
CEARÁ-BRASIL**

**2006**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fitotecnia como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Agronomia, área de concentração Fitotecnia outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra a disposição dos interessados na Biblioteca Central desta Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que feita de acordo com as normas da ética científica.

**Dissertação aprovada em** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Jean Carlos de Araújo Brilhante**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, Dr.**

Universidade Federal do Ceará

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Professor Orientador

---

**Francisco José Alves Fernandes  
Távora, Dr.**

Universidade Federal do Ceará

Departamento de Fitotecnia

Professor conselheiro

---

**Ricardo Almeida Viégas, Dr.**

Universidade Federal da Paraíba

Professor conselheiro

**Amai-vos uns aos outros**

**Assim como vos amei**

**-Jesus Cristo-**

## AGRADECIMENTOS

A deus, por me dar forças em todos os momentos.

A toda a minha família, pelo amparo e carinho.

Aos meus pais Francisca Altamira Pires de Araújo e José Brillhante Neto e meus irmãos Jeyms e Jefferson pelo amor e compreensão.

Ao meu avô Augusto Fernandes de Araújo e a minha tia Francisca Altair Pires de Araújo por tudo e algo mais.

À minha avó Terezinha Pires de Araújo, que mesmo não estando mais neste plano, esteve sempre presente em meu coração.

Aos meus grandes amigos Auriélio, Paulinho e Karol que estão comigo em todos os momentos de alegria e tristeza.

Ao professor Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, por não ter sido apenas um excelente orientador, mas um verdadeiro amigo e, principalmente, por ter me aturado em alguns momentos difíceis dessa jornada.

Ao professor Francisco José Alves Fernandes Távora, pela sua disponibilidade e interesse em contribuir para revisão deste trabalho.

Ao professor Ricardo Almeida Viégas, pela sua disponibilidade e interesse em contribuir para a revisão deste trabalho e também por ter me ajudado na redação de artigos científicos.

A Dr<sup>a</sup> Iza Marineves Almeida da Rocha, pela grande amizade e por ser a minha eterna Co-orientadora.

A Sandro Alexandre Marinho de Araújo, pela grande amizade, pela nossa ardorosa batalha durante o mestrado e enfim por todos os momentos alegres e difíceis passados juntos.

A todos os colegas do curso de Pós-graduação em Agronomia-Fitotecnia, com os quais convivi e das quais guardarei eternas recordações.

A todos os colegas do LABPLANT, Roberta, Josemir, Sérgio, Abel, João Paulo, Tânia, Batista, Luís, Rafael, Flávia, Geórgia, Fabio, Cristine e Eduardo pela excelente convivência e cooperação.

A funcionária Maria Edinilda (Nega) pela amizade e companheirismo.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	09
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	19
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	21
<b>RESUMO</b> .....	22
<b>ABSTRACT</b> .....	24
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	26
<b>1.1 Justificativa e importância da pesquisa</b> .....	26
<b>1.2. Revisão de literatura</b> .....	30
1.2.1 Os problemas causados pela salinidade e seca nos solos .....	30
1.2.2. Respostas das plantas aos efeitos provocados pela salinidade e seca.....	34
1.2.3. Mecanismos de tolerância das halófitas.....	40
1.2.4. O gênero <i>atriplex</i> .....	45
1.2.5. A erva sal ( <i>atriplex nummularia</i> lindl.) e sua importância .....	48
1.2.6. Ajustamento osmótico de plantas sob estresse salino e hídrico.....	52
1.2.7 Acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos em plantas sob estresse salino e hídrico.....	55
1.2.8 Tolerância cruzada .....	62
<b>2. HIPÓTESES E OBJETIVOS</b> .....	63
<b>2.1 HIPÓTESE GERAL</b> .....	63
<b>2.2 OBJETIVO GERAL</b> .....	63
<b>2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	63
<b>2.4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b> .....	64
<b>3. CAPÍTULO 1- “Contribuição Relativa de Solutos Orgânicos e Inorgânicos no Potencial Osmótico de Plantas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas a níveis crescentes de NaCl ”</b>	
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	65
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	71
3.2.1 Material vegetal .....	71
3.2.2 Local e condição experimental .....	71
3.2.3 Solução nutritiva .....	71
3.2.4 Condução e tratamento das plantas.....	72
3.2.5 Colheita das plantas e determinação da massa fresca e massa seca .....	73
3.2.6 – Determinações analíticas .....	73
3.2.6.1 - Conteúdo relativo de água (CRA), Umidade e Suculência foliar .....	73
3.2.6.2 - Integridade das membranas (vazamento de eletrólitos) .....	73
3.2.6.3 – Determinação do teor de cinzas .....	74
3.2.6.4 – Determinação da concentração de sódio e potássio.....	74
3.2.6.5 – Determinação da concentração de cloreto .....	74
3.2.6.6 – Determinação da concentração de cálcio e magnésio .....	75
3.2.6.7 – Determinação do teor de nitrato .....	75
3.2.6.8 – Determinação da concentração de fosfato e sulfato .....	75
3.2.6.9 - Açúcares solúveis totais .....	76

3.2.6.10 - Determinação de aminoácidos livres totais (N- $\alpha$ -amino livre) .....	77
3.2.6.11 - Concentração de proteínas solúveis .....	77
3.2.6.12 - Determinação do teor de prolina livre .....	78
3.2.6.13 – Determinação de glicina betaína .....	78
3.2.6.14 - Osmolalidade total, Potencial osmótico e Ajustamento osmótico .....	79
3.2.6.15 - Contribuição relativa de solutos inorgânicos e orgânicos para o potencial osmótico das folhas .....	79
3.2.7 - Delineamento experimental e análises dos resultados .....	79
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	80
<b>3.4 DISCUSSÃO</b> .....	96
<b>3.5 CONCLUSÃO</b> .....	104
<b>4. CAPÍTULO 2- “Efeitos do Pré-Condicionamento com NaCl no Potencial Osmótico de Plantas de <i>Atriplex nummularia</i> Expostas a Sucessivos Ciclos de Seca/Re-hidratação”</b>	
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	105
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	109
<b>4.3 RESULTADOS</b> .....	113
<b>4.4 DISCUSSÃO</b> .....	133
<b>4.5 CONCLUSÃO</b> .....	141
<b>5. CAPÍTULO 3- “Efeito do Pré-Condicionamento de Plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> com NaCl na Resposta a Seca Induzida por PEG”</b>	
<b>5.1 INTRODUÇÃO</b> .....	142
<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	145
<b>5.3 RESULTADOS</b> .....	151
<b>5.4 DISCUSSÃO</b> .....	163
<b>5.5 CONCLUSÃO</b> .....	166
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	167

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto visual do stand de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> após 60 dias de tratamento com doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM)	84
Figura 2	Stand de plantas e aspecto morfológico das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) após o período de 120 dias de tratamento.	85
Figura 3	Massa seca (A), cinzas (B) e massa seca orgânica (C) das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	86
Figura 4	Variação na umidade (A), Conteúdo relativo de água (B) e suculência (C) das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	87
Figura 5	Variação no conteúdo de sódio (A), cloreto (B) e potássio (C) total das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	88
Figura 6	Variação no conteúdo de cálcio (A) e magnésio (B) total das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	89
Figura 7	Variação no conteúdo de nitrato (A), fosfato (B) e sulfato das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	90

Figura 8	Variação na concentração de açúcares solúveis (A), proteínas solúveis (B) e aminoácidos livres (C) das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	91
Figura 9	Variação na concentração de prolina (A), percentual de prolina em relação ao pool de aminoácidos livres (B) e concentração de glicina betaina (C) das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	92
Figura 10	Variação na osmolalidade total (A), no potencial osmótico (B) e no ajustamento osmótico (C) das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	93
Figura 11	Contribuição relativa de solutos inorgânicos (A) e solutos orgânicos (B) na osmolalidade total das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	94
Figura 12	Aspecto visual das plantas de <i>Atriplex nummularia</i> após 48h de recuperação de três ciclos sucessivos de seca/re-hidratação. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (Controle) (A) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (Seca) (B) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (NaCl+seca) (C) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (NaCl) (D) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental.	118

Figura 13	Perda de turgor das folhas das plantas de <i>Atriplex nummularia</i> não pré-tratadas com NaCl e expostas a três ciclos sucessivos de seca/re-hidratação.	119
Figura 14	Variação na massa seca ( <b>A</b> ), cinzas ( <b>B</b> ) e massa orgânica seca ( <b>C</b> ) das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: ( <b>Controle</b> ) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; ( <b>Seca</b> ) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; ( <b>NaCl+seca</b> ) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e ( <b>NaCl</b> ) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey).	120
Figura 15	Variação na umidade ( <b>A</b> ) e no conteúdo relativo de água ( <b>B</b> ) das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: ( <b>Controle</b> ) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; ( <b>Seca</b> ) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; ( <b>NaCl+seca</b> ) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e ( <b>NaCl</b> ) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas	121

	iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)	
Figura 16	<p>Varição na suculência e no vazamento de eletrólitos das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: <b>(Controle)</b> corresponde ao controle irrigado a cada três dias; <b>(Seca)</b> são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; <b>(NaCl+seca)</b> são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e <b>(NaCl)</b> corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)</p>	122
Figura 17	<p>Varição no conteúdo de Sódio (A), Cloreto (B) e potássio (C) das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: <b>(Controle)</b> corresponde ao controle irrigado a cada três dias; <b>(Seca)</b> são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; <b>(NaCl+seca)</b> são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e <b>(NaCl)</b> corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey).</p>	123

<p>Figura 18</p>	<p>Variação no conteúdo de nitrato (A), cálcio (B) e magnésio (C) das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (<b>Controle</b>) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (<b>Seca</b>) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (<b>NaCl+seca</b>) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (<b>NaCl</b>) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)</p>	<p>124</p>
<p>Figura 19</p>	<p>Variação no conteúdo de fosfato (A) e sulfato (B) das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (<b>Controle</b>) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (<b>Seca</b>) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (<b>NaCl+seca</b>) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (<b>NaCl</b>) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)</p>	<p>125</p>

<p>Figura 20</p>	<p>Variação no conteúdo de açúcares solúveis (A), aminoácidos livres (B) e proteínas solúveis (C) das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (<b>Controle</b>) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (<b>Seca</b>) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (<b>NaCl+seca</b>) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (<b>NaCl</b>) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)</p>	<p>126</p>
<p>Figura 21</p>	<p>Variação no conteúdo de prolina (A) e glicina betaína (B) das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (<b>Controle</b>) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (<b>Seca</b>) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (<b>NaCl+seca</b>) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (<b>NaCl</b>) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)</p>	<p><u>127</u></p>

<p>Figura 22</p>	<p>Variação na osmolalidade total (A) e no potencial osmótico (B) das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (<b>Controle</b>) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (<b>Seca</b>) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (<b>NaCl+seca</b>) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (<b>NaCl</b>) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey</p>	<p>128</p>
<p>Figura 23</p>	<p>Variação no conteúdo de prolina (A) e glicina betaína (B) das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (<b>Controle</b>) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (<b>Seca</b>) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (<b>NaCl+seca</b>) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (<b>NaCl</b>) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)</p>	<p>129</p>

<p>Figura 24</p>	<p>Contribuição relativa de solutos inorgânicos na osmolalidade total das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: <b>(Controle)</b> corresponde ao controle irrigado a cada três dias; <b>(Seca)</b> são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; <b>(NaCl+seca)</b> são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e <b>(NaCl)</b> corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)</p>	<p>130</p>
<p>Figura 25</p>	<p>Contribuição relativa de solutos orgânicos na osmolalidade total das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: <b>(Controle)</b> corresponde ao controle irrigado a cada três dias; <b>(Seca)</b> são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; <b>(NaCl+seca)</b> são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e <b>(NaCl)</b> corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)</p>	<p>131</p>

Figura 26	Transferência de Plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> com dois meses de idade para sala de crescimento sob condições controladas.	147
Figura 27	Plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> pré-condicionadas com ou sem NaCl, submetidas a quatro tratamentos (Controle, PEG, NaCl, NaCl + PEG) em condições hidropônicas em sala de crescimento sob condições controladas por uma semana.	148
Figura 28	Sintomatologia das plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> pré-condicionadas com solução nutritiva e 200mM de NaCl, respectivamente, que foram tratadas posteriormente com ou sem PEG 29,5% m/v.	152
Figura 29	Variação no conteúdo relativo de água ( <b>A</b> ), na umidade ( <b>B</b> ), na suculência ( <b>C</b> ) e no vazamento de eletrólitos ( <b>D</b> ) das folhas de plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.	153
Figura 30	Variação no conteúdo de sódio ( <b>A</b> ), cloreto ( <b>B</b> ), potássio ( <b>C</b> ) e nitrato ( <b>D</b> ) das folhas de plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.	156
Figura 31	Variação na concentração de açúcares solúveis ( <b>A</b> ), proteínas solúveis ( <b>B</b> ) e aminoácidos livres ( <b>C</b> ) das folhas de plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.	157

Figura 32	Variação na concentração de prolina ( <b>A</b> ), no percentual de prolina do <i>pool</i> de aminoácidos livres ( <b>B</b> ) e na concentração de glicina betaína ( <b>C</b> ) das folhas de plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.	158
Figura 33	Variação na osmolalidade total ( <b>A</b> ), no potencial osmótico ( <b>B</b> ) e no ajustamento osmótico das folhas de plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.	160
Figura 34	Contribuição relativa de Solutos inorgânicos ( <b>A</b> ) e orgânicos ( <b>B</b> ) no potencial osmótico das folhas de plântulas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.	161

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da solução nutritiva utilizada na irrigação semanal das plantas de <i>Atriplex nummularia</i> Lindl.	72
Tabela 2	Contribuição relativa (%) de solutos inorgânicos na osmolalidade total das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	95
Tabela 3	Contribuição relativa (%) de solutos orgânicos na osmolalidade total das folhas de plantas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.	95
Tabela 4	Contribuição relativa de solutos inorgânicos na osmolalidade total das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: <b>(Controle)</b> corresponde ao controle irrigado a cada três dias; <b>(Seca)</b> são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; <b>(NaCl+seca)</b> são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e <b>(NaCl)</b> corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições.	132
Tabela 5	Contribuição relativa de solutos orgânicos na osmolalidade total das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: <b>(Controle)</b> corresponde ao controle irrigado a cada três dias; <b>(Seca)</b> são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; <b>(NaCl+seca)</b> são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e <b>(NaCl)</b> corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições.	132

Tabela 6	Contribuição relativa de solutos inorgânicos na osmolalidade total das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.	162
Tabela 7	Contribuição relativa de solutos orgânicos na osmolalidade total das folhas de <i>Atriplex nummularia</i> submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.	162

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AO	AJUSTAMENTO OSMÓTICO
CMO	CHOLINE MONOXIGENASE
BADH	BETAÍNA ALDEÍDO DESIDROGENASE
PEG	POLIETILENO GLICOL
PAR	RADIAÇÃO FOTOSSINTETICAMENTE ATIVA
BSA	ALBUMINA SORO BOVINO
GB	GLICINA BETAÍNA
CRA	CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA (CRA),
AALT	AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS (AALT)
MOS	MATÉRIA ORGÂNICA SECA
CE	CONDUTIVIDADE ELÉTRICA
MF	MASSA FRESCA
MS	MASSA SECA

## RESUMO

Uma das características fisiológicas mais importantes das halófitas pertencentes ao gênero *Atriplex* é a enorme habilidade de acumular solutos orgânicos e inorgânicos com o intuito de se ajustar osmoticamente em condições de elevada salinidade e deficiência hídrica. Contudo estudos compreensivos sobre a contribuição relativa desses solutos inorgânicos e orgânicos no ajustamento osmótico de folhas dessas halófitas ainda são poucos explorados na literatura. Esse trabalho pretende pela primeira vez na literatura fazer um estudo detalhado, da participação e da contribuição relativa da maioria dos solutos orgânicos e inorgânicos no potencial osmótico de folhas de *Atriplex nummularia*, submetidas a concentrações crescentes de NaCl, ciclos sucessivos de seca e ao polietileno glicol (PEG). Para responder as questões acima mencionadas foram conduzidos três grandes experimentos seqüenciais. No primeiro experimento, mudas de *Atriplex nummularia* com quatro meses de idade, foram cultivadas em vasos de argila contendo como substrato areia, sendo irrigadas a cada dois dias com solução contendo concentrações crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400 mmol L<sup>-1</sup>) durante 120 dias. O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação. No segundo experimento, mudas de *A. nummularia*, com idade de 18 meses foram transplantadas para recipientes de polietileno contendo 5.0 kg de vermiculita, em condições de casa de vegetação, onde foram submetidas aos seguintes tratamentos (Controle; seca; NaCl + seca; NaCl) por três ciclos sucessivos de seca-re-hidratação (3 semanas) seguido de uma recuperação no final do último ciclo (após 48 h). No terceiro experimento, plântulas de *A.nummularia*, com idade de dois meses foram transplantadas para cultivo hidropônico em vasos plásticos com capacidade para 0,8 em sala de crescimento sob condições controladas onde sofrerão um pré-condicionamento com ou sem NaCl por duas semanas. Após foram submetidas aos seguintes tratamentos (controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG). Em conclusão, os resultados da presente investigação demonstram que as plantas de *Atriplex nummularia* foram capazes de

manter o seu crescimento mesmo em condições de alta salinidade, principalmente pela capacidade de manutenção de seu status hídrico. Os resultados também sugerem que a GB é o maior soluto orgânico envolvido com o ajustamento osmótico (AO) do citoplasma e que sua acumulação parece ser uma resposta adaptativa ao estresse provocado pelo NaCl. Em adição, o íons salinos  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  contribuíram para a maioria do AO das folhas submetidas ao NaCl. O impacto relativo do  $\text{K}^+$  sobre o AO das folhas foi reduzido consideravelmente com o aumento da dose externa de NaCl. Os resultados evidenciam também que o pré-condicionamento com NaCl influenciou positivamente no crescimento de *Atriplex nummularia*, em condições de seca, evidenciado pelo maior acúmulo de massa seca e melhor *status* hídrico das folhas. Dentre os solutos inorgânicos analisados, o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  foram os que mais contribuíram para a osmorregulação das folhas em condições de deficiência hídrica. Enquanto, GB foi o soluto orgânico mostrou o maior percentual de contribuição para o potencial osmótico. Entretanto os resultados mostraram que o pré-condicionamento das plântulas de *Atriplex nummularia* com NaCl não foram capazes de atenuar os efeitos induzidos pelo PEG.

Palavras Chave: *Atriplex nummularia*, NaCl, PEG, Seca, Solutos orgânicos e solutos inorgânicos.

## **ABSTRACT**



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DA PESQUISA

As plantas cultivadas nas regiões tropicais, semi-áridas, estão sujeitas as condições ambientais adversas, dentre elas à deficiência hídrica, salinização dos solos e temperaturas extremas (Yancey *et al.*, 1982). Dentre estes, a seca e o estresse salino são os agentes abióticos estressores mais relevantes e mais estudados pela comunidade científica, o que se comprova pela grande produção literária em torno dessa temática. A seca é provavelmente um dos mais importantes fatores que limita a produtividade agrícola nas grandes regiões do mundo (Jones & Corlett, 1992), principalmente nas regiões semi-áridas. Nessas condições, a habilidade das plantas em manter o status hídrico das células (ajustamento osmótico) e a integridade celular pode ser uma vantagem adaptativa. O crescimento e a sobrevivência das plantas a condições de alta salinidade dependem da adaptação a baixos potenciais hídricos e altas concentrações de sódio. Três aspectos são relevantes à tolerância das plantas ao sal: (1) homeostase iônica, (2) detoxificação e (3) controle do crescimento (Zhu, 2001a).

Atualmente, verifica-se um aumento no interesse da comunidade científica pelas respostas fisiológicas das plantas a condições de estresses ambientais, devido ao fato de muitos dos mecanismos utilizados ainda não serem completamente compreendidos. Uma vez entendidas, as estratégias fisiológicas de reações aos estresses ambientais, estas poderão ser utilizadas como ferramentas nos programas de melhoramento vegetal, para a produção de plantas economicamente viáveis, que sejam tolerantes a esses estresses ambientais (Bor *et al.*, 2003).

Em glicófitas, os estresses ambientais como seca e salinidade, interferem drasticamente no crescimento e na produtividade vegetal, pois afeta os principais processos fisiológicos das plantas (Boyer, 1982; Yancey *et al.*, 1982). As halófitas possuem características morfofisiológicas específicas que permitem realizar suas funções vitais na presença de sais e

superar baixos potenciais osmóticos no ambiente radicular (Poljakoff-Mayber, 1975). As Halófitas acumulam altas concentrações de íons inorgânicos dentro das células, com o intuito de baixar o potencial hídrico e garantir assim a absorção de água para poder crescer em solos com problemas de excesso de sais (Glenn & Brown, 1999).

Uma das estratégias encontradas para o problema da salinidade é o aumento da tolerância ao sal das espécies agrícolas convencionais, apesar do baixo rendimento anual, ou o desenvolvimento de culturas tolerantes, através do melhoramento convencional e da engenharia genética (Tester & Davenport, 2003). A maioria das mais de 2500 espécies de halófitas existentes no mundo ocorre em ambientes salinos costeiros e no interior de desertos, aumentando assim a atenção para a pesquisa com halófitas, utilizando se rejeitos salinos ou a água do mar, na irrigação em larga escala (Pasternak & Nerd, 1996; Lieth *et al.*, 1999). Sendo o uso dessas halófitas domesticadas importantíssimo nas regiões áridas e semi-áridas afetadas com problemas de salinidade, pois são adaptadas a crescer em substratos com alta salinidade (Pasternack, 1990).

Pela grande quantidade de espécies de halófitas existentes no mundo, umas das recentes ferramentas descobertas é o uso de halófitas domesticadas para combater o problema da salinidade, pois elas representam um importante modelo de estudo das características fisiológicas que conferem tolerância à salinidade (Lieth *et al.*, 1999) Essas plantas são modelos viáveis de estudo dos mecanismos que elas usam para sobreviver em altas concentrações de sal, com o intuito de melhorar a tolerância de espécies vegetais não halófitas.

Em respostas a esses estresses ambientais, muitas plantas sintetizam e acumulam compostos de massa molecular pequena, assim como açúcares álcoois, prolina e glicina betaína (Hellebust, 1976; Yancey *et al.*, 1982), os quais são denominados de osmólitos, osmoprotetores ou solutos compatíveis. A função exata desses compostos, nas plantas, embora seja desconhecida, pode estar relacionada à proteção dos vegetais a estresses abióticos, funcionando como uma

ferramenta para o ajustamento osmótico celular (Hellebust, 1976). Além dessa função principal no ajustamento osmótico, os solutos compatíveis podem ajudar na estabilização de macromoléculas (osmoprotetores) e proteção contra danos oxidativos sob condições adversas (Yeo, 1998).

O ajustamento osmótico é um mecanismo usado para a manutenção do turgor e redução dos efeitos deletérios do estresse hídrico sobre tecidos vegetais (Flowers *et al.*, 1991), porém o papel efetivo do ajustamento osmótico no crescimento de espécies agrícolas em condições de seca é bastante discutido (Sinclair & Serraj, 2002). A síntese de solutos compatíveis é um dos processos metabólicos utilizados na engenharia genética da tolerância ao sal, por causa da suspeita de seu papel efetivo nos processos de ajustamento osmótico e osmoproteção de tecidos estressados (Bohnert *et al.*, 1995; Hare *et al.*, 1998). Vários trabalhos têm recentemente discutido a osmoproteção em plantas e sua potencial aplicação na tolerância à seca e a salinidade (Holmstrom *et al.*, 1996; Hare & Cress, 1997; Zhang *et al.*, 1999; Rathinasabapathi, 2000).

Algumas espécies de halófitas pertencentes ao gênero *Atriplex*, tais como a *Atriplex nummularia* são bem adaptadas para sobreviver em condições ambientais adversas, constituindo um excelente material para identificação de mecanismos fisiológicos envolvidos com a resistência a esses estresses abióticos (Shen *et al.*, 2003; Wang & Showalter, 2004). Uma das características fisiológicas mais importantes das espécies pertencentes ao gênero *Atriplex* é a enorme habilidade de acumular solutos orgânicos e inorgânicos com o intuito de se ajustar osmoticamente em condições de elevada salinidade (Martinez *et al.*, 2005). A *Atriplex nummularia*, comumente conhecida como erva-sal é originária de regiões desérticas da Austrália, essa espécie consegue manter o seu crescimento em concentrações elevadas de NaCl (Araújo, 2003). Em condições de doses crescentes de NaCl, a *Atriplex nummularia* conseguiu acumular em suas folhas altas concentrações íons salinos e de glicina betaína (Araújo *et al.*, 2006). Contudo

estudos compreensivos sobre a contribuição relativa de solutos inorgânicos importantes como o  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e o  $\text{K}^+$  versus solutos orgânicos importantes como a prolina e a glicina betaína no ajustamento osmótico de folhas dessas espécies de halófitas ainda são poucos explorados na literatura.

O atual trabalho apresenta pela primeira vez dentro a literatura, um estudo detalhado ao nível de planta inteira, da participação e da contribuição relativa da maioria dos solutos orgânicos e inorgânicos no potencial osmótico de folhas, utilizando a extraordinária *Atriplex nummularia*, uma típica espécie de halófitas, como modelo, em resposta ao estresse salino e hídrico.

## 1.2. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 OS PROBLEMAS CAUSADOS PELA SALINIDADE E SECA NOS SOLOS

A salinidade é definida como o excesso de íons inorgânicos no solo ou no meio de cultivo das plantas, representando um dos principais problemas da agricultura mundial (Lacerda, 1995). A situação é mais grave nas regiões árida e semi-áridas devido às condições favoráveis de salinização. Entretanto, com a expansão da agricultura irrigada e do uso intensivo dos fertilizantes químicos, o problema tende a se agravar em diversas regiões (Oliveira, 1997). O processo natural de salinização dos solos envolve a acumulação de íons, principalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  e  $\text{HCO}_3^-$ , nas camadas agriculturáveis dos solos (Oliveira, 1997). Dessa forma, a salinidade provoca modificações químicas e físicas, com conseqüências sobre a atividade biológica do solo (Santos & Muraoka, 1997).

As principais alterações químicas provocadas pela salinização dos solos são na composição e balanço de cátions nos complexos de troca e solução do solo, com reflexos no pH, na capacidade de troca iônica e disponibilidade de nutrientes (Santos & Muraoka, 1997). No caso dos solos sódicos, o excesso de  $\text{Na}^+$  provoca alterações nas propriedades físicas do solo, reduzindo a floculação das argilas e a estabilidade dos agregados, provocando como conseqüência, reduções na porosidade e capacidade de retenção de água (Lima, 1997). O excesso de sais provoca diminuição na pressão osmótica e toxicidade para o desenvolvimento da fauna e flora, diminuindo as taxas de mineralização e humificação da matéria orgânica, com conseqüente redução da fertilidade dos solos (Santos & Muraoka, 1997).

A seca é provavelmente um dos mais importantes fatores que limita a produtividade agrícola nas grandes regiões do mundo (Jones & Corlett, 1992), principalmente nas regiões semi-áridas. A seca é definida como um prolongado período sem água. Para um período de seca afetar uma comunidade de planta, o déficit de chuva deve levar a um déficit hídrico do solo e por

último, a um déficit hídrico da planta (Levitt, 1980). O grau no qual deficiência de chuva provoca um déficit de água no solo depende da taxa de evaporação durante o período sem chuva e das características físicas e químicas do solo. O grau em que a falta de água no solo influencia as plantas, depende também da umidade relativa da atmosfera e de uma série de características das plantas que influenciam a absorção de água, como a taxa de transpiração. É o grau no qual a planta pode suportar a falta de chuva que caracteriza sua resistência à seca (Paleg & Aspinall, 1981; Hanson & Hitz, 1982; Schulze, 1986).

A salinidade no solo existe muito antes de se tornar um problema econômico para o homem. Entretanto, esse problema vem sendo agravado por práticas agrícolas deletérias (Zhu, 2001). Para a agricultura, o problema da salinidade existe quando os sais acumulam-se na zona radicular, em concentrações elevadas suficientemente capazes de restringir a absorção de água pela planta. Isso pode provocar estado de deficiência hídrica, até causar sintomas muito semelhantes aos provocados pela estiagem (Ayers & Westcot, 1991).

A salinidade dos solos tem se constituído em um problema para a agricultura de regiões áridas e semi-áridas do mundo, limitando o crescimento e a produtividade das culturas e ocasionando enormes prejuízos sócio-econômicos (Gheyi, 2000; Munns, 2002). Com o aumento da frequência de período de seca, a intensificação da produção de alimentos depende do uso de agricultura irrigada e da eficiência na administração de recursos hídricos limitados. A ampliação da agricultura irrigada e o uso intensivo de águas de qualidade duvidosa, combinada com a alta taxa evaporativa, têm se chamado a atenção para o problema da salinidade no solo e na água do solo (Lambers, 2003).

A progressiva salinização de áreas irrigadas é uma limitação para o futuro da agricultura em muitas áreas do mundo. A superação dos problemas do estresse salino tem um impacto positivo na produção agrícola mundial. Numerosos estudos têm sido feitos para melhorar

a tolerância das culturas agrícolas ao sal através de programas de melhoramento tradicional, porém sucessos comerciais têm sido muito limitados (Cuartero & Fernandez-Munoz, 1999). A salinidade dos solos é responsável pelas maiores reduções na produtividade agrícola no mundo (Gouia *et al.*, 1994). O problema é mais grave nas regiões árida e semi-árida. Entretanto, com o uso intensivo da irrigação, a salinização dos solos tende a aumentar, particularmente nas regiões com condições de altas taxas de evaporação, águas de baixa qualidade e técnicas não apropriadas de manejo da água e do solo (Medeiros & Gheyi, 1997).

No mundo, estima-se que 19,5% das terras irrigadas (45 milhões de hectares) e 2,1% das terras não irrigadas (32 milhões de hectares) estejam afetadas por sais (FAO, 2000). A salinização dos solos é particularmente evidente nas regiões áridas e semi-áridas, atingindo cerca de 25% das áreas irrigadas. Atualmente, estima-se que o mundo perde cerca de 1,5 milhões de hectares de terras aráveis a cada ano devido ao acúmulo de sais (FAO, 2000). Dessa forma, a salinização tem sido identificada como o principal processo de degradação dos solos. No Brasil, embora a informação sobre áreas salinizadas não estejam bem definidas, estima-se que 20 a 25% das áreas irrigadas enfrentam problemas de salinização (FAO, 2000). Este problema é mais conspícuo na região Nordeste, a qual possui uma área de 155 milhões de hectares, sendo que 52% dessa superfície é semi-árida (Lira *et al.*, 1982).

No nordeste brasileiro, dos 1.600.000 km<sup>2</sup> de terra, cerca de 1.500.000 km<sup>2</sup> são caracterizados como insuficientes em água, constituindo o chamado “polígono das secas” (Dantas *et al.*, 2002). Nessa região, a irrigação assume papel fundamental no progresso da agricultura. No entanto, a prática da irrigação aumenta as concentrações de sais na superfície do solo (Dantas *et al.*, 2002). Como prova, estima-se atualmente que no mundo, 25% dos solos irrigados estão afetados por diferentes níveis de salinidade (Rhoades *et al.*, 2003). A incorporação de novas áreas irrigadas tende a aumentar o problema da salinização dos solos (Pereira *et al.*, 1985). O nordeste

brasileiro, além de possuir 20 a 25% da área irrigada com solos afetados por sais, principalmente os do tipo sódico, os tipos de água armazenada nos lençóis freáticos, são predominantemente salinas (Holanda & Amorim, 1997).

O potencial de áreas irrigáveis na região nordeste do Brasil é de 4.177.500 ha, sendo o total da área irrigada em 1988 de 619.500 ha, o que corresponde somente a 15% do total irrigável (Souza, 1990). A região do semi-árido chega a atingir cerca de 50% da área irrigada (Goes, 1978). A maioria dessas áreas apresenta problemas de salinidade, sendo a má drenagem dos solos o principal fator responsável, enquanto que a qualidade da água apareceu como a causa menos importante (Bukovinszky *et al.*, 1992). Os recursos hídricos disponíveis são suficientes para irrigar 36% das áreas do semi-árido (Lacerda, 1995). A maioria dos solos salinos dessa região é do tipo Aluvial, onde predominam os sais de sódio (Fernandes, 1993). Um levantamento em 129 açudes da região mostrou que o NaCl era o sal mais encontrado, com a concentração de Cl variando de 0 a 4000 ppm ou 0 a 113 mM (Wright, 1981).

Com o agravamento dos problemas de salinização dos solos no nordeste, em virtude do crescimento da área utilizada com culturas irrigadas, o sucesso da atividade agrícola pode ser alcançado através de práticas de manejo de solo que sejam capazes de reduzir a salinidade do solo, ou de selecionar genótipos tolerantes ao estresse salino. Como o primeiro procedimento é dispendioso, demorado e, às vezes, impraticável, a segunda opção apresenta-se muito promissora (Dantas *et al.*, 2002).

## **1.2.2. RESPOSTAS DAS PLANTAS AOS EFEITOS PROVOCADOS PELA SALINIDADE E SECA**

A salinidade é um dos maiores problemas encontrados nas áreas agrícolas (Szabolcs, 1994), pois aproximadamente 7% da superfície terrestre e 5% das terras cultivadas do mundo são afetadas por problemas de excesso de sais no solo (Flowers *et al.*, 1997). Para enfrentar esse problema, algumas pesquisas, têm sido enfatizadas na investigação dos efeitos da salinidade na fisiologia das plantas, com o objetivo de detectar caracteres moleculares e celulares para o melhoramento de plantas tolerantes ao sal (Hasegawa *et al.*, 2000). Apesar dos avanços no aumento da produtividade e resistência a pragas e doenças nas culturas agrícolas, entretanto a tolerância à salinidade ainda permanece desconhecida, principalmente porque a mesma afeta simultaneamente vários processos da fisiologia da planta.

As espécies vegetais diferem extensamente na resposta ao crescimento em condições de altas concentrações de sais, sendo extremamente importante à caracterização de mecanismos fisiológicos de tolerância ao sal. Esses mecanismos servem de base na seleção e melhoramento de plantas à salinidade (Koryo, 2003). As plantas têm que reagir fisiologicamente ao menos a quatro principais impedidores do crescimento em ambientes salinos: (a) controle da taxa de crescimento e morfologia; (2) resistência ao déficit hídrico (redução do potencial hídrico); (3) regulação da entrada de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pelos estômatos e (4) evitar a toxicidade iônica e o desbalanço nutricional (Munns, 1993; Marschner, 1995; Volkmar *et al.*, 1998; Munns, 2002; Koryo, 2003; Rengasamy *et al.*, 2003).

As plantas quando classificadas de acordo com o tipo de ambiente em que se desenvolvem podem ser divididas em: Hidrófitas, quando crescem em ambientes que sempre apresentam ampla disponibilidade de água; Mesófilas, em ambientes com disponibilidade

intermediária de água; Xerófitas, em ambientes com escassez de água; Halófitas, em ambientes com altas concentrações de sais e Glicófitas, quando não são capazes de se desenvolver em ambientes com alta concentração de sais (Prisco, 1989). Nas glicófitas está à maioria das espécies de plantas exploradas economicamente, diferentemente das halófitas.

O estresse osmótico gerado pela seca e salinidade representam os mais comuns estresses ambientais, que limita o crescimento vegetal e a produtividade das culturas (Koryo, 2006). A redução do potencial hídrico nos habitats salinos gera na planta dois grandes componentes, um iônico e outro osmótico. A absorção e a acumulação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nos diferentes órgãos da planta é altamente controlada (Munns, 1995; Hasegawa *et al.*, 2000). As espécies resistentes ao sal tem processos especiais de remoção do NaCl do citoplasma, como por exemplo a compartimentalização dos íons salinos nos vacúolos (Muhling & Lauchli, 2002). O crescimento e sobrevivência das plantas a condições de alta salinidade dependem da adaptação a baixos potenciais hídricos e altas concentrações de sódio. Três aspectos são relevantes à tolerância das plantas ao sal: (1) homeostase iônica, (2) detoxificação e (3) controle do crescimento (Zhu, 2001b).

O sal afeta negativamente o fluxo de água próximo às raízes das plantas, devido a um decréscimo na permeabilidade hídrica do solo e na condutividade hidráulica das raízes. Como resultado, a permeabilidade das membranas celulares e o influxo de água para a planta são reduzidos (Waisel, 1972). Muitos dos efeitos deletérios do  $\text{Na}^+$ , são relacionados à integridade funcional e estrutural das membranas celulares (Kurth *et al.*, 1986). Uma das respostas metabólicas ao estresse salino é a síntese de osmolitos compatíveis. Eles mediam o ajustamento osmótico, protegem estruturas subcelulares e reduz os danos oxidativos em resposta a salinidade (Hare *et al.*, 1998). Esses compostos osmoticamente ativos são açúcares poliois, aminoácidos e compostos quartenários de amônio (Rhodes & Hason, 1993).

A tolerância ao sal não requer somente adaptação à toxicidade pelo  $\text{Na}^+$ , mas também à aquisição de  $\text{K}^+$ , um nutriente essencial (Rodríguez-Navarro, 2000). O potássio tem sua absorção afetada pela alta concentração externa de sódio devido à similaridade química desses dois íons. Portanto, os sistemas de transporte de potássio envolvendo uma seletividade maior por  $\text{K}^+$  do que por  $\text{Na}^+$  pode ser considerada como um fator determinante para a tolerância ao sal (Rodríguez-Navarro, 2000).

O excesso de sais no solo também pode diminuir a disponibilidade de água para o vegetal. Em adição ao estresses iônicos, provocados pelo excesso de íons salinos como o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$ , o estresse salino também causa estresse osmótico, como ocorre em situação de seca severa. Concentrações elevadas de sais no solo reduzem o potencial hídrico do meio, reduzindo assim a disponibilidade de água para a planta (Winicov, 1998; Zhu, 2001b). Esses dois estresses, de forma muito semelhante ao estresse por deficiência hídrica, causam danos fisiológicos ou provocam estresses secundários como os danos oxidativos. Cada estresse, primário ou secundário, originado a partir da exposição ao sal, ou a deficiência hídrica, possui sua própria cascata de sinalização, via metabólica e estratégia de adaptação e tolerância (Zhu, 2001a).

O estresse iônico e osmótico causado pela salinidade pode resultar na restrição do crescimento vegetal. Eventos celulares como a compartimentalização de íons salinos e o ajustamento osmótico nas plantas tolerantes ao sal, pode permitir a manutenção do crescimento mesmo na presença de altas concentrações de sais no solo (Volkmar *et al.*, 1998). Nas plantas que acumulam grandes quantidades de sais na célula, os íons salinos são estocados nos vacúolos, contribuindo assim para o ajustamento osmótico. Solutos orgânicos induzidos pelo sal podem ter um importante papel na proteção celular e no ajustamento osmótico do citossol e das organelas. (Khan *et al.*, 1998). Com isso, a habilidade das plantas se ajustar osmoticamente ao desbalanço

iônico provocado pelo excesso de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas células, é muito importante na manutenção do crescimento.

A salinidade também afeta as concentrações de  $\text{K}^+$  encontradas na plantas, um componente essencial para o ajustamento osmótico celular, principalmente para o fenômeno de abertura e fechamento estomático (Maathuis & Amtmann, 1999). De acordo com Serrano & Rodriguez-Navarro (2001), durante o estresse salino ocorre um decréscimo na absorção de potássio ( $\text{K}^+$ ) e um aumento no influxo de sódio ( $\text{Na}^+$ ). Como o  $\text{Na}^+$  é tóxico (Amzallag *et al.*, 1990) e o  $\text{K}^+$  é o soluto que mais contribui para a manutenção da pressão osmótica e da força iônica, as plantas estressadas com NaCl ativam transportadores de cátions no tonoplasto e plasmalema, para manter a sua homeostase iônica.

O efeito tóxico sobre o metabolismo celular e fisiológico, pelo acúmulo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nos tecidos e a redução na disponibilidade de água, causada pela diminuição do potencial hídrico do solo, pode explicar danos fisiológicos como a redução do crescimento de plantas, quando submetidas à salinidade (Zhu, 2001b). Nesse contexto, muitos estudos realizados sobre a sinalização do estresse hídrico, focalizam o estresse salino, devido às respostas ao sal e à seca serem intrinsecamente relacionadas e os mecanismos de resposta e sinalização, sobrepostos. Por um ponto de vista prático o estresses salino pode ser imposto com mais facilidade e precisão em experimentos de laboratório (Zhu, 2002).

A expansão e a divisão celular podem ser afetadas diretamente pelo estresse salino, pois reduz a atividade de proteínas kinases dependentes de ciclina que participam do ciclo celular (Wang *et al.*, 1998). A habilidade das plantas em sobreviver e manter o seu crescimento sob condições salinas é conhecido como tolerância ao sal, sendo uma característica que depende de inúmeros fatores, incluindo a espécie vegetal. Existe uma enorme variação na tolerância das plantas às condições de altas concentrações de sais no solo, que vai desde a sensibilidade das

glicófitas à resistência das halófitas (Volkmar *et al.*, 1998). Essa habilidade em sobreviver em ambientes salinos é importante para a distribuição ecológica das espécies vegetais e na agricultura de regiões áridas e semi-áridas salinizadas.

A seca é provavelmente um dos mais importantes fatores que limita a produtividade agrícola nas grandes regiões do mundo (Jones & Corlett, 1992), principalmente nas regiões semi-áridas. O crescimento celular parece ser a resposta mais sensível ao estresse hídrico. O estresse hídrico é um expressivo problema para a produção vegetal, pois existe um efeito inibitório na acumulação de biomassa (Nonami *et al.*, 1997; Mullet & Whitsitt, 1996). Decrescendo o potencial de água de semente – 0,1 Mpa (às vezes menos) resulta o decréscimo perceptível no crescimento celular (irreversível alongamento celular) e assim redução no crescimento da raiz e da parte aérea (Sakurai & Kuraishi, 1988). Hsiao (1973) sugere que esta sensibilidade é responsável pela observação de que muitas plantas crescem principalmente à noite, quando o estresse hídrico é menor. A inibição da expansão celular é comumente seguida por uma redução na síntese de parede celular (Salisbury & Ross, 1992). Síntese de proteína pode ser quase igualmente sensível ao estresse hídrico (Nobel, 1992).

Em condições de deficiência hídrica, a habilidade das plantas em manter o status hídrico das células (ajustamento osmótico) e a integridade celular pode ser uma vantagem adaptativa. Mudanças nas propriedades de elasticidade do tecido e na concentração de solutos podem promover a manutenção do turgor e volume celular apesar do baixo potencial hídrico (Ayoub *et al.*, 1992). A manutenção do turgor durante mudanças no status hídrico da planta pode preservar processos metabólicos da planta e contribuir para o crescimento em condições de escassez de água. Sob condições de seca, a manutenção do turgor da célula pode ocorrer pelo ajustamento osmótico por uma acumulação líquida de solutos para obter um gradiente favorável de potencial hídrico. O ajustamento osmótico, entretanto, tem uns custos energéticos alto, que

pode afetar negativamente a produtividade da planta e o uso eficiente da água (Turner & Jones 1980).

Atualmente sabe-se que os efeitos da seca na produção vegetal provocam alterações no metabolismo e no crescimento. Sua intensidade é diretamente dependente do estágio fisiológico em que o organismo se encontra e da sua severidade. O processo de crescimento celular, através da síntese de proteínas e de parede celular, é o mais sensível às reduções na disponibilidade de água nos tecidos (Salisbury & Rossi, 1991; Nobel, 1992). A falta de água também pode afetar a eficiência dos processos fotossintéticos (Keles & Oncell, 2002).

Entretanto, os mecanismos moleculares que respondem às reduções no potencial de água e que desencadeiam os processos responsáveis pela paralisação do alongamento celular, ainda não são bem entendidos. Acredita-se que, tais processos, são mediados pelo ácido abscísico (ABA), o qual é encontrado em grande quantidade, durante o estresse hídrico (Bray, 1993; Ingram & Bartels, 1996). Adicionalmente, várias espécies vegetais exibem aumento nas concentrações de substâncias nitrogenadas como prolina, betaínas, citrulinas (Rabe, 1993), além de sacarose e açúcares-álcoois, como o pinitol (Ingram & Bartels, 1996), utilizando-os como estratégia para o ajustamento osmótico e prevenção da perda de água e subsequente desidratação celular (Handa *et al.*, 1986). Apesar dos anos de pesquisas sobre o estudo do déficit hídrico em plantas superiores, os processos moleculares que são mais rapidamente afetados, como também os mecanismos iniciais da resposta molecular, ainda não estão bem compreendidos (Bray, 1993).

Sabe-se atualmente, que as inúmeras espécies vegetais apresentam enorme diversidade de mecanismos fisiológicos para adaptação à seca, apesar desses mecanismos ainda não serem completamente compreendidos (Ingram & Bartels, 1996). De certa forma, é sabido que a primeira etapa no disparo das respostas moleculares ocorre através da percepção do estresse e o subsequente repasse da informação por uma via de transdução de sinais. Estas vias,

eventualmente, promovem mudanças fisiológicas, como o fechamento estomático, expressão gênica e modificações em processos celulares e moleculares. As vias que conduzem os estímulos da seca e do estresse salino são interconectadas pelos estresses primários e pelas respostas conferidas (homeostase, desintoxicação e controle do crescimento). Dentre as vias de sinalização, destaca-se a via SOS como mediadora da homeostase iônica e tolerância ao Na<sup>+</sup>; a cascata de proteínas quinases (MAPK) mediadora da homeostase osmótica; e a cascata de proteínas do tipo LEA (*late embryogenesis activated*), responsáveis pelas vias que promovem a desintoxicação ou alívio dos danos oxidativos (Zhu, 2001b).

O conhecimento sobre estas vias de sinalização aumenta a cada ano (Knight & Knight, 2001). Ao contrário do era veiculado anteriormente, as vias de sinalização não são isoladas uma das outras, participando de uma maior e complexa rede de vias, com diversas sobreposições entre as cadeias. Esse fato permite especular, que muitos genes podem ser induzidos por mais de um estímulo em particular (Knight & Knight, 2001).

### **1.2.3. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA DAS HALÓFITAS**

A maioria do estresse salino sob as plantas é provocado pelos sais de sódio, particularmente o NaCl. Plantas que podem crescer na presença de altas concentrações de sais de sódio são chamadas de halófitas (Flowers & Yeo, 1987). As halófitas são tolerantes a salinidade, porque são abeis para absorver água nessas condições adversas, através da diminuição do potencial osmótico pela acumulação íons salinos (Bradley & Morris, 1991). As halófitas são conhecidas pela habilidade de se adaptar e viver em habitat salino, alterando o seu metabolismo energético (Winicov & Bastola, 1997).

Essas plantas são modelos viáveis de estudo dos mecanismos que elas usam para sobreviver em altas concentrações de sal, com o intuito de melhorar a tolerância de espécies

vegetais não halófitas. Uma variedade de mecanismos contribui para a tolerância ao sal de halófitas (Gorham, 1995). Os mecanismos encontrados nas halófitas que favorecem a sobrevivência em ambientes salinos incluem a regulação da concentração dos íons tóxicos, adaptação osmótica, adaptação de enzimas, produção de osmoprotetores, adaptação estomática, compartimentalização de íons salinos e outras formas de controle genético.

A suculência foliar, ou seja, a diluição do sal acumulado pelo aumento do conteúdo hídrico por área, é uma adaptação morfológica típica ao estresse osmótico (Popp, 1995). Tem se observado existir nas halófitas uma correlação entre a absorção de íons salinos e a suculência da planta inteira (Waisel, 1972). O papel da suculência para o balanço do sal absorvido em espécies de halófitas não-secretoras já tem sido amplamente descrito (Popp, 1995), existindo uma correlação positiva entre o aumento da concentração de sódio no tecido e a suculência das folhas (Murakeozy *et al.*, 2003).

Com o objetivo de balancear a toxicidade iônica gerada em condições salinas, a planta aumenta sua suculência através do aumento do conteúdo hídrico total da planta. Porém ainda é discutido se esse aumento da suculência em halófitas em condições de salinidade é uma resposta adaptativa (Waisel, 1972). A suculência é vista como um aumento no tamanho de célula, na diminuição em extensão do crescimento, na diminuição na superfície de área por volume de tecido, e no elevado conteúdo de água por unidade de superfície de área (Siew & Klein, 1969; Drennan & Pammenter, 1982). As plantas suculentas têm folhas densas, principalmente devido ao aumento no tamanho das células do mesófilo foliar e pequenos espaços intracelulares.

Folhas suculentas de plantas de feijão afetadas por sal tem tido mais mitocôndrias que folhas de plantas não estressadas, evidenciando talvez uma energia extra, necessária nessas plantas estressadas, para a compartimentalização e excreção de sal (Siew & Klein, 1969). A alta

suculência foliar e um alto conteúdo relativo de água é uma estratégia adaptativa que contribui para a regulação da concentração iônica interna em muitas halófitas diante de condições ambientais adversas (Short & Colmer, 1999). A suculência foliar diminuiu em *Atriplex amnicola* (Aslam *et al.*, 1986) e *Sarcocornia natalensis* (Naidoo & Rughuanan, 1990) quando estas foram tratadas com altas concentrações de NaCl.

Muita das halófitas altamente tolerantes ao sal é “incluidoras” de sal e são abeis para resistir altas concentrações de sais no tecido (Flowers *et al.*, 1986). Isto sugere que a compartimentalização de íons nos vacúolos e a acumulação de solutos compatíveis no citoplasma, bem como a presença de genes que confirmam tolerância ao sal, são mecanismos importantes para a resistência dessas espécies a ambientes salinos (Gorham, 1995). Halófitas acumulam altas concentrações de íons inorgânicos dentro das células, com o intuito de baixar o potencial hídrico e garantir assim a absorção de água para poder crescer em solos com problemas de excesso de sais (Glenn & Brown, 1999; Zhao *et al.*, 2003). Em condições de alta transpiração, o xilema de todas as espécies de halófitas contém concentrações muito mais baixas de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> do que o ambiente salino externo. A regulação do conteúdo de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> no tecido e a absorção de K<sup>+</sup> é considerado vital na adaptação das plantas à salinidade (Munns *et al.*, 1993).

As halófitas podem crescer e sobreviver em ambientes salinos pela facilidade em selecionar Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e seqüestrar para os vacúolos (Muhling & Lauchli, 2002). Esse sistema de compartimentalização conseqüentemente funciona como um ciclo metabólico regulatório para evitar concentrações críticas na célula. Esse mecanismo de adaptação tem tido uma função homeostática, no suprimento metabólico de elementos essenciais, bem como desintoxicação (Koryo, 2000; Smekens & Tiederren, 2001; Koryo, 2003).

Em condições salinas, a concentração de sal pode alcançar níveis três vezes maiores que o meio externo (Munns, 1983). A habilidade das células vegetais em manter baixas concentrações de sódio no citossol é um processo essencial para as halófitas (Borsani *et al.*, 2003). As células vegetais respondem ao estresse salino pelo aumento do efluxo de  $\text{Na}^+$  para a membrana celular ou compartimentalização nos vacúolos (Borsani *et al.*, 2003), e genes envolvidos nesses processos são considerados determinantes na tolerância ao sal. Estudos recentes têm identificado vias para a entrada de  $\text{Na}^+$  nas células (Zhu, 2000) e a clonagem de Antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tem demonstrado o papel da compartimentalização intracelular do  $\text{Na}^+$  na tolerância das plantas ao estresse salino (Ohta *et al.*, 2002).

A tolerância ao sal não requer somente adaptação à toxicidade pelo  $\text{Na}^+$ , mas também à aquisição de  $\text{K}^+$ , um nutriente essencial (Rodríguez-Navarro, 2000). O potássio tem sua absorção afetada pela alta concentração externa de sódio devido à similaridade química desses dois íons. Portanto, os sistemas de transporte de potássio envolvendo uma seletividade maior por  $\text{K}^+$  do que por  $\text{Na}^+$  pode ser considerada como um fator determinante para a tolerância ao sal (Rodríguez-Navarro, 2000). A introdução de um gene antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de *Atriplex gmelum* para arroz conferiu resistência a 300mM de NaCl (Ohta *et al.*, 2002), sendo isso uma importante ferramenta para promover a tolerância a salinidade nas culturas agrícolas num futuro próximo, onde a transferência genética possa ocorrer em larga escala.

Recente descoberta de uma classe de proteínas de membrana, chamadas de aquaporinas, sugeriu a existência de muitas possibilidades para a intercompartimentalização do movimento de água (Maurel, 1997). Em termos de tolerância ao sal, a existência dessas aquaporinas, pode ser um mecanismo para a manutenção da homeostase osmótica e o turgor das células de plantas sob estresse salino.

Algumas plantas tolerantes ao sal conseguem sobreviver em ambientes salinos, essas espécies de halófitas, conseguem evitar a toxicidade iônica e manter a absorção de água em altas concentrações de sal (Flowers *et al.*, 1977). Dois mecanismos gerais de adaptação celular a salinidade observada nas halófitas é a acumulação de osmoprotetores, como glicina betaína e/ou prolina, e o controle do movimento de íons tóxicos (Bohnert *et al.*, 1995). Sendo esses fatores importantes para o crescimento das plantas em regiões áridas e semi-áridas com problemas de excesso de sais no solo (Glenn *et al.*, 1996). A compartimentalização de Na<sup>+</sup> nos vacúolos e a síntese de solutos osmoticamente compatíveis, como prolina e glicina betaína, para o ajustamento osmótico é uma das principais estratégias de algumas halófitas para manutenção do crescimento em condições de alta salinidade (Moghaieb *et al.*, 2004).

Já é bastante conhecido, que o estresse salino induz inúmeras mudanças na expressão gênica de diferentes espécies de plantas. Os níveis de betaína e outros osmoprotetores tipicamente aumentam durante a exposição a diferentes estresses abióticos como a salinidade, déficit hídrico e baixa temperatura, pela indução de enzimas relacionadas com a biossíntese desses osmoprotetores (Rhodes & Hanson, 1993). Esses osmoprotetores são largamente confinados no citossol, organelas e são quase ausentes nos vacúolos (Weretilnyk & Hanson, 1989). Prolina e glicina betaína são solutos compatíveis que são acumulados em resposta ao estresse osmótico, sendo considerado essa acumulação uma importante estratégia adaptativa ao estresse salino e hídrico (Rhodes & Hanson, 1993).

As halófitas são caracterizadas pela alta capacidade de ajustar o potencial hídrico do tecido a um nível que é mais negativo que o potencial hídrico do solo do habitat em que ela está crescendo (Ungar, 1991). O crescimento e a sobrevivência de halófitas são dependentes dos altos níveis de acumulação de íons nos tecidos, para a manutenção do turgor e ajustamento osmótico (Flowers *et al.*, 1977). Nas plantas que acumulam grandes quantidades de íons salinos em suas

células, tais como as halófitas em geral, os vacúolos têm um papel central no ajustamento osmótico. A síntese de solutos orgânicos induzidos pelo sal, que são compatíveis com proteínas e outras funções dos biomoleculares, desempenha um importante papel na proteção celular e no ajustamento osmótico do citossol e de organelas (Khan *et al.*, 1998).

Apesar do esforço das pesquisas em compreender melhor, os mecanismos de absorção e compartimentalização do Na<sup>+</sup> nas plantas, a informação geral e precisa sobre como o Na<sup>+</sup> entra nas células e em tecidos de halófitas, ainda não está disponível na literatura (Kurkova & Balnokin, 1994). Em algumas espécies de halófitas os antiportes vacuolares parecem ser constitutivos (Glenn *et al.*, 1999), conseqüentemente ativado constantemente mesmo nas plantas crescidas na ausência do NaCl. Isto ajuda a compreender porque plantas de *Atriplex nummularia*, possuem uma alta concentração de sódio nas folhas mesmo em condições de ausência de NaCl. Resultados similares foram relatados em *Atriplex halimus*, crescida em condições hidropônicas sem nenhuma adição de NaCl no meio (-0,025 MPa), onde o potencial osmótico da folhas foi maior que -1,5 MPa, o que evidencia uma alta atividade dessas plantas para íons inorgânicos em geral (Galé & Poljakoff-Mayber, 1970).

#### **1.2.4. O GÊNERO ATRIPLEX**

As espécies pertencentes ao gênero *Atriplex* são plantas arbustivas, de ambientes áridos e semi-áridos, que se desenvolve bem em solos com alto teor de sal. É conhecido em muitos lugares pelo nome de “erva sal”. O gênero *Atriplex* conta com mais de 400 espécies distribuídas nas diversas regiões áridas e semi-áridas do mundo. Pelo seu alto valor protéico, as plantas de *Atriplex* são usadas como forragem para caprinos, ovinos e bovinos. São usadas também, nos processos de dessalinização de solos, na produção de lenha, como plantas medicinais e na culinária.

As plantas de *Atriplex* retiram do solo grande quantidade de sal para utilizar nos seus processos vitais. O processo de dessalinização se inicia quando os arbustos são podados duas ou três vezes ao ano, a uma altura de meio metro do solo. A produção de cinco toneladas de matéria seca/ano de *Atriplex* significa uma extração de 1.000kg de sal por hectare/ano. Em regiões de solos profundos e precipitações anuais variando entre 200-400mm, a *Atriplex nummularia* e a *Atriplex halimus* podem produzir de cinco a dez toneladas de matéria seca por hectare. Os rendimentos variam conforme a espécie de planta usada, tipo de solo, conteúdo de sal no solo, chuvas anuais e tipo de manejo dispensado à cultura. Geralmente a produção de matéria seca de *Atriplex* em diversas partes do mundo tem variado entre três e 15 toneladas por hectare.

Os arbustos de *Atriplex* preferem os climas áridos e semi-áridos. Manifestam ótimo crescimento em regiões com chuvas anuais entre 100 e 500mm. São altamente resistentes ao estresse hídrico, requerem muita luz e temperaturas diurnas entre 25 e 40°C, atingindo seu melhor crescimento entre as latitudes de 20° e 50° norte e sul, respectivamente, e em altitudes que variam desde o nível do mar até  $\pm 1.500\text{m}$ . As plantas adaptam-se bem em solos secos e pobres em nutrientes, desde os argilosos até os arenosos, salinos, altamente alcalinos e calcários, com pH entre 6 e 9, não sobrevivendo por muito tempo em solos encharcados. Toleram solos pouco profundos, de textura média e com altos níveis de salinidade (condutividade elétrica no solo, superior a  $50\text{dS. cm}^{-1}$ )

Para o aproveitamento do subproduto dos dessalinizadores, uma das alternativas propostas tem sido a irrigação de espécies halófitas, entre as quais se destacam as do gênero *Atriplex*, incluindo a *Atriplex nummularia* (Porto *et al.*, 1997; Porto & Araújo, 2000). Além de bem adaptadas a solos áridos e salinos, estas plantas são capazes de tolerar condições climáticas adversas, sendo utilizadas em programas de reabilitação de solos em várias regiões áridas e semi-áridas em processo de degradação ou sujeitas à desertificação (Glenn *et al.*, 1998). O cultivo de

espécies do gênero *Atriplex* pode ser uma alternativa viável para a região Nordeste, principalmente quando sua produção estiver atrelada à utilização dos rejeitos dos dessalinizadores de água salobra.

Uma das características fisiológicas mais importantes das espécies pertencentes ao gênero *Atriplex* é a enorme habilidade de acumular solutos orgânicos e inorgânicos com o intuito de se ajustar osmoticamente em condições de elevada salinidade (Martinez *et al.*, 2005). Muitas espécies do gênero *Atriplex* são enormemente adaptadas a condições ambientais extremas como seca e salinidade, possuindo inúmeras características fisiológicas adaptativas (Martinez *et al.*, 2003), servindo de modelo para a identificação de mecanismos fisiológicos e genéticos envolvidos com a resistência a esses estresses abióticos (Wang & Showalter, 2004).

O gênero *Atriplex* está entre o possuidor de espécies de plantas superiores mais tolerantes ao sal, possuindo uma adaptação à salinidade, por tolerar altas concentrações internas de sais e/ou pela excreção de sais (Khan *et al.*, 2000). Contudo, a presença de altos níveis de sal não tem sido requerida para um crescimento ótimo. Diferentes estudos têm demonstrado que baixos níveis de salinidade não têm um efeito deletério sobre o crescimento de espécies do gênero *Atriplex* (Zid & Boukharis, 1977; Matoh *et al.*, 1986). Essa idéia tem sido confirmada em estudos mais recentes com *Atriplex griffithii* (Khan *et al.*, 2000) e *Atriplex nummularia* (Ramos *et al.*, 2004).

Halófitas pertencentes ao gênero *Atriplex*, mostraram uma estimulação do crescimento em concentrações de NaCl que inibem o crescimento em plantas não halófitas (Osmond *et al.*, 1980). Ashby & Beadle (1957) mostraram que o crescimento de ambas, *Atriplex inflata* F. Muell. e *Atriplex nummularia* Lindl., Foi maior em 600mM de NaCl do em condições controles. O crescimento de *Atriplex nummularia* foi ótimo em concentrações entre 100-200 mM de NaCl (

Greenway, 1968). A presença de altos níveis de  $K^+$  no meio foi mais tóxico para o crescimento de *Atriplex nummularia* que a presença de altos níveis de  $Na^+$  (Ramos *et al.*, 2004).

### **1.2.5. A ERVA SAL (*Atriplex nummularia* Lindl.) E SUA IMPORTÂNCIA**

A erva sal (*Atriplex nummularia* Lindl.) é uma das espécies forrageiras da família *Chenopodiaceae*, originária da Austrália, que tem se adaptado muito bem nas regiões áridas e semi-áridas da América do sul, em particular da Argentina, Chile, Brasil (Nordeste). O nome de erva sal é devido à particularidade de que essa planta possui de absorver sal através de seu sistema fisiológico, tendo, portanto, o sabor salgado. É sabido que a erva sal foi introduzida no semi-árido brasileiro na década de quarenta, através dos trabalhos de pesquisa do pesquisador Guimarães Duque (Obras, 1938), mas somente nestas últimas décadas é que ela tem recebido mais a atenção da comunidade científica. A planta pertencente ao gênero *Atriplex* é do tipo arbusto, considerada perene, que dependendo do favorecimento do ambiente de cultivo, pode atingir altura de até 3,00 m, apresentando uma média de 1,50 m. No caso da experiência de cultivo no semi-árido brasileiro, plantas com um ano de idade atingiram uma média de 2,20 m, e o sistema radicular pode atingir uma profundidade de 3,50 m (Porto & Araújo, 2000).

#### **CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA:**

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

Superdivisão: *Spermatophyta*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Subclasse: *Caryophyllidae*

Ordem: *Caryophyllales*

Família: *Chenopodiaceae*

Gênero: *Atriplex spp.*

Espécie: *Atriplex nummularia* Lindl.

A erva sal é uma planta de metabolismo C<sub>4</sub>, o que lhe confere uma alta eficiência no uso da água. O aumento da salinidade resulta em maior suculência, conservando a água no interior do tecido vegetal, reduzindo a taxa de transpiração. A *Atriplex nummularia* é uma das halófitas que apresentam maior tolerância ao sal, conforme Glenn *et al.*, (1998), vários experimentos tem sido conduzidos com esta espécie, sendo irrigada com água do mar vermelho e do mar do golfo pérsico, que apresentam elevados teores de sais na ordem de 40 gramas de sal por litro, superiores aos teores de sais encontrados na maioria dos oceanos, que é de 35 a 36 gramas por litro, demonstrando assim, grande avidez por sais principalmente Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>

Segundo Porto & Araújo (2000), a tolerância desta espécie de halófito é devida ao desenvolvimento de mecanismos especializados de acumulação no interior da planta, ou de eliminação de sais por meio de vesículas especiais existentes na superfície das folhas. Quando cheias essas vesículas ou pústulas se rompem liberando o sal, através de finas camadas de cristais, que se aderem à superfície da folha. Esses cristais de sal ajudam na economia de água pela planta, por meio da reflexão da radiação solar, reduzindo, conseqüentemente, a temperatura da folha e mantendo assim a turgidez das células. Assim sendo, a planta age desta forma, não com o objetivo de se tornar especialista em absorção de sais, mas, como forma de ajustar-se ao ambiente adverso (Glenn *et al.*, 1998).

Segundo os dados da FAO (1996), as características que lhe dão importância são: alta resistência a condições de aridez, bom rendimento forrageiro, com valor nutritivo entre 14 e 17% de proteína bruta, alta poder calorífico e pouca susceptibilidade a pragas e doenças. Uma peculiaridade desta planta é que ela requer sódio como elemento essencial em sua nutrição.

Entretanto, Campbell & Matthewson (1992) observaram que a produção de mudas por meio de sementes apresenta limitações em função das dificuldades de germinação. Devido a esse motivo, as mudas são obtidas por meio de propagação vegetativa, o que garante um padrão genético uniforme.

Segundo Mckell (1994), várias espécies de atriplex são excelentes forragens para consumo animal, devido ao seu favorável conteúdo de proteína bruta. Nesse contexto se insere a erva sal (*A. nummularia* Lind.) no semi-árido como um grande potencial par ao fornecimento de alimentação animal, principalmente no período da seca em que é escassa a pastagem nativa. A planta tem sido utilizada, em várias regiões áridas e semi-áridas do mundo, como um recurso forrageiro importante na complementação de dietas para ruminantes e não-ruminantes. Furtado (2002), em teste de palatibilidade, constatou que houve uma maior aceitação da erva sal por parte de suínos.

Por ser uma planta de regiões áridas, a sua produtividade reflete muito nas condições ambientais. A produção de matéria seca conseguida em diversas partes do mundo tem variado de 2,8 a 15,3 toneladas por hectare por ano, englobando condições ambientais onde chovem 200mm por ano até áreas irrigadas com água do mar ou rejeito proveniente da dessalinização de água salobra (Porto & Araújo, 1999). Vale ressaltar que quanto maior a sua performance produtiva, melhor será a mobilização dos sais do solo e a produção de lenha e de material forrageiro.

De acordo com O'Leary (1986), a *Atriplex nummularia* está entre as mais nutritivas espécies da família *Chenopodiaceae*. Devido ao seu valor protéico satisfatório, compara-se com forrageiras consideradas nobres, como a alfafa. Outra peculiaridade desta espécie é que suas sementes produzem substâncias antifúngicas, principalmente contra *Fusarium spp.* (Last & Llewellyn, 1997). A *Atriplex nummularia* pode ser usada, também, no combate a erosão e para

fixação de dunas (Herrera, 2001) Atualmente, esta planta tem se destacado na perspectiva do desenvolvimento de espécies apropriadas para a irrigação com água do mar (Glenn *et al.*, 1995).

Nos últimos anos tem sido crescente o uso da dessalinização de água salobra, com elevados níveis de sais, provenientes de poços perfurados no cristalino, com o objetivo de garantir água potável para as populações da zona rural que são acometidas pelos efeitos da seca, originando o rejeito produto do processo de osmose reversa, sendo que esse rejeito não sofre nenhum tratamento, e é depositado no solo gerando a degradação do mesmo. Segundo Porto *et al.*, (1997), a deposição deste rejeito poderá trazer, em um curto intervalo de tempo, sérios problemas para as comunidades que estão se beneficiando desta tecnologia, principalmente em termos pedológicos. Em muitos países, o cultivo de plantas halófitas forrageiras, em especial a erva sal, tem sido usada não apenas para recuperar solos salinizados, mas também, como estratégia para o uso do rejeito da dessalinização de água salobra, reduzindo o impacto da degradação ambiental e, ao mesmo tempo, possibilitando a produção de forragem em áreas com baixo potencial produtivo (Boegli & Thullen, 1996).

Segundo Porto & Araújo (2000), a maior acumulação de sais ocorre nas folhas, em experimento conduzido na Embrapa Semi-Árido, em plantação irrigada com rejeito de dessalinização, o teor de cinzas das diferentes partes da planta em relação à matéria seca foi o seguinte: folha 25,23%, caule fino 8,62%, caule grosso 4,04% e lenha 3,18%. A partir destes dados, a estimativa é que a acumulação de sais na planta foi correspondente a 1.145 Kg/ha/ano, para as condições de semi-árido brasileiro.

De acordo com vários autores, baixos níveis de salinidade não apresentam efeitos deletérios sobre o crescimento de espécies do gênero *Atriplex* pelo contrário estimulam o crescimento (Ashby & beadle, 1957; Chatterton & Mckell, 1969). Porém, altos níveis de salinidade podem causar redução no crescimento da parte aérea (Greenway, 1968; Mozafar *et al.*,

1970; Richardson & Mckell, 1980). Estudos recentes têm evidenciado também um papel importante do gênero *Atriplex* na fitorremediação de solos afetados por metais pesados (Lutts *et al.*, 2004).

### **1.2.6. AJUSTAMENTO OSMÓTICO DE PLANTAS SOB ESTRESSE SALINO E HÍDRICO**

O estresse hídrico é um expressivo problema para a produção vegetal, pois existe um efeito inibitório na acumulação de biomassa (Nonami *et al.*, 1997; Mullet & Whitsitt, 1996). Em condições de deficiência hídrica, a habilidade das plantas em manter o status hídrico das células (ajustamento osmótico) e a integridade celular pode ser uma vantagem adaptativa. Mudanças nas propriedades de elasticidade do tecido e na concentração de solutos podem promover a manutenção do turgor e volume celular apesar do baixo potencial hídrico (Ayoub *et al.*, 1992). A manutenção do turgor durante mudanças no status hídrico da planta pode preservar processos metabólicos da planta e contribuir para o crescimento em condições de escassez de água.

O ajustamento osmótico é um mecanismo usado para a manutenção do turgor e redução dos efeitos deletérios do estresse hídrico sobre tecidos vegetais (Flowers *et al.*, 1991). O ajustamento osmótico é considerado um componente importante na tolerância à seca e à salinidade em plantas. É bem conhecido que o ajustamento osmótico envolve a acumulação líquida de solutos nas células em resposta à salinidade e conseqüentemente, o decréscimo no potencial hídrico, ocasiona a entrada de água para a célula e com isso mantém o turgor. Nas halófitas *Salicornia europaea* e *Suaeda marítima*, o potencial osmótico decresceu de -1,5MPa até cerca de -6,0MPa em 510mM de NaCl, evidenciando o ajustamento osmótico dessas espécies (Moghaieb *et al.*, 2004).

O ajustamento osmótico (AO) é definido como a diminuição do potencial hídrico da planta devido à acumulação líquida de solutos em resposta ao estresse hídrico, pode servir como um mecanismo de tolerância á seca em várias espécies vegetais (Blum, 1989; Zhang *et al.*, 1999; Chimenti *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Tem sido freqüentemente sugerido que o objetivo do ajustamento osmótico (AO) é a manutenção do crescimento pela capacidade de manter o turgor em baixos potenciais osmóticos externos. Porém não houve uma correlação entre o ajustamento osmótico e a produção de biomassa em *Atriplex halimus* sob condições de estresse hídrico (Martinez *et al.*, 2004).

O ajustamento osmótico envolve a ativa acumulação de solutos orgânicos e inorgânicos nas células, em resposta a uma queda no potencial hídrico do ambiente celular. Como consequência, o potencial osmótico da célula é diminuído, o que atrai água para a célula, tendendo manter a pressão de turgescência. Geralmente, o ajustamento osmótico contribui para a manutenção do turgor em ambos, folhas e raízes, sob estresse hídrico. Essa manutenção de turgor depende de processos como o crescimento e atividade estomática para continuar em um baixo potencial hídrico (Babu *et al.*, 1999). Outros fatores afetam a manutenção do turgor em condições de estresse hídrico, como uma grande elasticidade do tecido e um menor volume celular. O relacionamento entre a manutenção do turgor e o crescimento é bem complexo.

De acordo com idéias mais recentes sobre o mecanismo de extensibilidade da parede celular, a ampliação da célula começa com uma redução, ou um relaxamento da parede. Conseqüentemente, a pressão do turgor e o potencial da água são reduzidos (o turgor é o componente principal do potencial hídrico) e a água é extraída da célula. O resultado é que a expansão da célula pela absorção de água (processo reversível), iniciado por uma produção de parede celular (processo irreversível). A síntese e a deposição de novos materiais na parede celular são necessárias durante ou após a extensão da célula, para prevenir a ruptura da parede em

um crescimento subsequente. Anote que a síntese da parede por si mesmo é insuficiente para causar a extensão da célula e que não induz a absorção de água. Um afrouxamento da rede load-bearing na parede celular é necessário para reduzir o turgor e causar desse modo à absorção de água (Cosgrove, 1993). Assim, é possível que agentes envolvidos com o afrouxamento da parede celular possam ser inibidos nas células com um baixo potencial de turgor o bastante para impedir o crescimento. Neste caso, nenhuma correlação é encontrada entre o turgor e o crescimento, como é observado freqüentemente (Munns, 1988), mas a falta de uma correlação não é suficiente para desprover o papel do turgor no crescimento (Feng *et al.*, 1994).

Sob condições de seca, a manutenção do turgor da célula pode ocorrer pelo ajustamento osmótico por uma acumulação líquida de solutos para obter um gradiente favorável de potencial hídrico. O ajustamento osmótico, entretanto, tem um custo energético alto que pode afetar negativamente a produtividade da planta e o uso eficiente da água (Turner & Jones 1980). O acúmulo massivo de carboidratos solúveis para o ajustamento osmótico (Bohnert *et al.*, 1995; Tattini *et al.*, 2002) desvia mais a energia avaliada para o crescimento e por sua vez pode afetar negativamente a taxa líquida assimilatória por um mecanismo de feed-back (Munns & Termaat, 1986; Herbers & Sonnewold, 1998; Sonnewold, 2001). O uso de solutos orgânicos em vez de íons tóxicos para o ajustamento osmótico de tecidos vegetais estressados é um processo consumidor de energia ao nível celular (Flowers *et al.*, 1977; Greenway & Munns, 1980; Hare *et al.*, 1998). Porém o custo metabólico ao nível de planta inteira é menor que a conversão de solutos orgânicos em nova biomassa (Munns & Termaat, 1986).

A manutenção de um alto conteúdo relativo de água em condições de déficit hídrico é usualmente bem correlacionada com a produção de biomassa (Teulat *et al.*, 1997). Muitas halófitas regulam o turgor pela acumulação de NaCl, para alcançar concentrações mais elevadas do que aquela no meio salino. Em plantas do gênero *Atriplex*, a acumulação de íons durante o

ajustamento osmótico das folhas, parece ocorrer principalmente nos vacúolos e estruturas da superfície das folhas, onde os íons salinos são impedidos de entrar em contato com enzimas citosólicas e de organelas. Dessa maneira, a compartimentalização de íons salinos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) nos vacúolos somente pode ser realizada se o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  forem transportados ativamente para dentro dos vacúolos e se a permeabilidade do tonoplasto para esses íons é suficiente para sustentar o gradiente de concentração iônica e o extenso gasto de energia (Maathius *et al.*, 1992). Os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  podem assim contribuir para o ajustamento osmótico de células de folhas de plantas de *Atriplex nummularia* (Flowers *et al.*, 1977; Glenn & Brown, 1999; Ramos *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2006).

### **1.2.7 ACÚMULO DE SOLUTOS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS EM PLANTAS SOB ESTRESSE SALINO E HÍDRICO**

Em resposta a diversas condições de estresse, muitas plantas acumulam metabólitos compatíveis no citoplasma de suas células, na tentativa de combater o estresse hídrico e salino (Bohnert *et al.*, 1995; Munns, 2002). Esses solutos compatíveis são importantes para o balanço osmótico e ao mesmo tempo, compatíveis com o metabolismo celular. Além dessa função principal no ajustamento osmótico, os solutos compatíveis podem ajudar na estabilização de macromoléculas (osmoprotetores) e proteção contra danos oxidativos sob condições adversas (Yeo, 1998).

A acumulação de solutos compatíveis em plantas tem chamado a atenção durante os últimos anos (Ingram & Bartels, 1996; Bohnert & Jensen, 1996; Hare *et al.*, 1998). Vários trabalhos têm recentemente discutido a osmoproteção em plantas e sua potencial aplicação na tolerância à seca e a salinidade (Holmstrom *et al.*, 1996; Hare & Cress, 1997; Zhang *et al.*, 1999;

Rathinasabapathi, 2000). Tem sido hipotetizado que esses compostos beneficiam células estressadas de duas formas: (1) pela ação com osmolitos citoplasmáticos, desse modo facilitando a absorção e retenção de água (Hare *et al.*, 1998) e (2) proteção e estabilização de estruturas e macromoléculas (proteínas, membranas, cloroplastos e lipossomos) dos danos induzidos por condições adversas (Bohnert & Jensen, 1996).

Uma das respostas metabólicas ao estresse salino é a síntese de osmolitos compatíveis. Eles mediam o ajustamento osmótico, protegem estruturas subcelulares e reduzem os danos oxidativos em resposta a salinidade (Hare *et al.*, 1998). Esses compostos osmoticamente ativos são açúcares poliois, aminoácidos e compostos quaternários de amônio (Rhodes & Hason, 1993).

Sob estresse salino, um fator chave na acumulação de solutos em células vacuoladas é a sua compartimentalização subcelular. À medida que quantidades excessivas de íons salinos entram no citoplasma, eles inibem as atividades de muitas enzimas. Um mecanismo de proteção importante é a compartimentalização desses íons salinos 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. Em adição, o acúmulo destes compostos no citoplasma pode proteger as membranas celulares, as proteínas e a maquinaria metabólica, o que pode preservar a estrutura subcelular dos danos resultantes da desidratação (Serraj & Sinclair, 2002). Como o volume do citoplasma nas células do mesófilo e do córtex radicular representa, em média, 10% do volume celular, a quantidade de carbono necessária à síntese de solutos orgânicos para o ajustamento osmótico é, em geral, relativamente pequena.

A restrição da absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  pelas raízes, caules e folhas, durante o estresse salino é um mecanismo importante de tolerância em glicófitas (Wahome *et al.*, 2001), as quais

são sensíveis às altas concentrações de íons salinos, principalmente devido a baixa atividade antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Gruwel *et al.*, 2001). Interessantemente, ao contrário das glicófitas, que são injuriadas com o decréscimo do potencial hídrico e acúmulo de íons salinos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) no citosol, as halófitas não sofrem tanto os efeitos deletérios causados pela alta concentração de  $\text{NaCl}$ , devido a um avançado sistema transportador de íons. As halófitas utilizam a absorção controlada de  $\text{Na}^+$ , para o interior dos vacúolos, como estratégia fisiológica para manter a absorção de água, em um ambiente externo com potencial hídrico reduzido (Gruwel *et al.*, 2001). Acredita-se, portanto, que o ajustamento osmótico permite às plantas manterem a turgescência celular compatível ao crescimento. Dessa forma, os solutos orgânicos contribuem para o balanço osmótico intracelular e proteção de enzimas citoplasmáticas, quando as concentrações de íons nos vacúolos são elevadas.

Dependendo da acumulação do osmolito, as halófitas são classificadas em três fisiotipos (Stewart *et al.*, 1979; Briens & Larher., 1982): (1) espécies que produzem altos níveis de carboidratos solúveis e/ou poliois, enquanto os compostos nitrogenados solúveis estão presentes em muito baixa concentração; (2) plantas que acumulam compostos nitrogenados solúveis em maior concentração que carboidratos não-estruturais e (3) espécies que acumulam ambos carboidratos e solutos nitrogenados, permanecendo o primeiro quantitativamente predominante.

Em adição ao aumento da concentração de açúcares, a seca e a salinidade estimulam também um aumento na concentração de alguns aminoácidos, dentre eles a prolina, que é um soluto osmoticamente compatível citoplasmático muito comumente acumulado nas plantas sob estresses hídrico e salino. A prolina possui várias funções tais como: estabilização de membranas e proteínas, proteção contra temperaturas extremas, sal e danos oxidativos (Samaras *et al.*, 1995). A síntese de prolina e sua degradação têm sido mostradas ser altamente correlacionada com o

ambiente osmótico e a habilidade de sua acumulação tem sido usada como base para seleção à tolerância á seca em várias espécies. Contudo em algumas espécies vegetais a acumulação de prolina não está relacionada diretamente com a tolerância ao estresse salino, sendo apenas resultado de distúrbios generalizados no metabolismo de aminoácidos associado com o aumento do catabolismo de proteínas, a senescência induzida pela salinidade ou outros distúrbios metabólicos provocados pelo sal (Lutts *et al.*, 1996; Lutts *et al.*, 1999; Viégas & Silveira, 1999; Silveira *et al.*, 2003; Rocha, 2003).

O acúmulo de prolina, não esteve envolvido com o ajustamento osmótico de plantas de *Atriplex halimus* sob estresse hídrico, pois seu conteúdo em folhas foi relativamente baixo e não foi modificado em resposta ao déficit hídrico, enquanto o conteúdo relativo de água e o potencial osmótico foram significativamente decrescidos (Martinez *et al.*, 2004), apesar de estudos terem mostrado que a prolina tem um importante papel na tolerância a seca de xerófitas (Wang *et al.*, 2004). Porém em condições de estresse salino, Bajji *et al.* (1998) observou um aumento nos níveis de prolina nas folhas de *Atriplex halimus*. Isto poderia sugerir que as alterações devido ao estresse hídrico são menos importantes que os danos causados pelo sal ou talvez que os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  pode ter um efeito tóxico adicional provocando diretamente a over-produção de prolina independente do componente osmótico do estresse salino. O impacto de íons específicos sobre a síntese de prolina já foi registrado em outros experimentos (Girija *et al.*, 2002). Prolina não teve um papel importante na osmorregulação de algumas espécies de halófitas sob estresse salino (Song *et al.*, 2006).

Em contraste, houve um aumento na concentração de glicina betaína nas folhas de *Atriplex halimus* em resposta ao estresse hídrico (Martinez *et al.*, 2004). A acumulação de glicina betaína tem sido frequentemente registrada sob condições de estresse hídrico e salino, tendo sido usualmente considerado ter um efetivo papel fisiológico na osmorregulação de compartimentos

citoplasmáticos celulares, na proteção de proteínas e na estabilização de membranas (Sakamoto & Murata, 2000). Sob condições de estresse salino, os níveis de compostos quaternários de amônio foram aumentados em folhas de *Atriplex halimus*, porém a contribuição de glicina betaína para o ajustamento osmótico foi muito pequena (< 0,3%) (Bajji *et al.*, 1998). Entretanto, por glicina betaína, o maior composto quaternário de amônio em Chenopodiaceae, ser predominantemente localizada nos cloroplastos (Rhodes & Hanson, 1993), a sua concentração inferida pode ser subestimada extremamente em relação aos níveis de organelas intactas.

Glicina betaína é um composto quaternário de amônio, que age como estabilizador osmótico e ajuda na proteção de macromoléculas sob desidratação, sendo considerado um excelente osmoprotetor (Yeo, 1998). Em plantas superiores, a via biossintética de glicina betaína é curta e direta: choline monooxigenase (CMO) converte choline para betaína aldeído, que é por sua vez é convertido em betaína pela betaína aldeído desidrogenase (BADH) (Burnet *et al.*, 1995). O aumento da expressão de transcritos de BADH em resposta ao estresse osmótico tem sido amplamente observado (Ishitani *et al.*, 1995; Moghaieb *et al.*, 2004).

Glicina betaína é ausente em muitas espécies agrícolas importantes como tomate e arroz, mas é acumulada em grandes quantidades sob condições de estresse hídrico e salino em plantas pertencentes à família *Chenopodiaceae* (McCue & Hanson, 1990), especialmente no caso do gênero *Atriplex*. Em muitas espécies de plantas, a acumulação de prolina e glicina betaína pode ocorrer concomitante (Girija *et al.*, 2002), porém permanece desconhecido como a acumulação de glicina betaína pode reduzir a extensão da acumulação de prolina (Gibon *et al.*, 1997). Nas xero-halófitas arbustivas do mediterrâneo, como a *Atriplex halimus*, ocorre a acumulação de prolina, compostos quaternários de amônio, açúcares solúveis em suas células quando expostas a salinidade, tanto ao nível de tecido como de planta inteira (Bajji *et al.*, 1998).

Espécies de família Chenopodiaceae produzem glicina betaína em resposta ao estresse hídrico e salino (Marcum & Murdoch, 1992). Evidências circunstanciais indicam que a acumulação de glicina betaína induzida pelo estresse é adaptativa, desde que pode funcionar como um osmótico compatível ou um osmoprotetor. Uma correlação positiva entre a concentração de sal e a acumulação de glicina betaína foi registrada em várias halófitas como em *Atriplex semibaccata* e *Atriplex halimus* (Koheil *et al.*, 1992), *Spartina alterniflora* (Cavaliere, 1983), *Atriplex griffithii*, *Suaeda fruticosa*, *Haloxylon recurvum*, *Halopyrum mucronatum* (Khan *et al.*, 1998) e em um grande número de espécies de grama (Marcum, 1995). A concentração de glicina betaína em folhas de *Atriplex barclayana* aumentou enormemente quando cultivadas em 100mM de NaCl e permanecendo constante até o nível de 400mM de NaCl (Nerd & Pasternak, 1992).

A acumulação de açúcares solúveis em plantas em resposta ao estresse hídrico é bem documentada e tendo sido considerado ter um importante papel no ajustamento osmótico (Kameli & Losel, 1995; Hare *et al.*, 1998; Bajji *et al.*, 2001). Em espécie pertencente ao Gênero *Atriplex* ambos, o K<sup>+</sup> e o Na<sup>+</sup> estão envolvidos no ajustamento osmótico de tecidos foliares submetidos a um baixo potencial hídrico externo que pode ser causado, por baixa umidade do solo ou problemas de excesso de sais no solo (Osmond *et al.*, 1980). Em geral, o K<sup>+</sup> é acumulado em resposta à baixa umidade do solo, enquanto o Na<sup>+</sup> é acumulado sob condições salinas (Glen *et al.*, 1996). Estudos têm evidenciado o papel do Na<sup>+</sup> na osmorregulação em plantas sob condições de estresse salino, enquanto os solutos orgânicos são importantes em condições de déficit hídrico (Song *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, uma considerável atenção tem sido dada sobre o envolvimento do Na<sup>+</sup> no ajustamento osmótico de espécies de halófitas. A implicação do Na<sup>+</sup> no processo de ajustamento osmótico pode ser considerada, assumindo que este é principalmente presente nos

vacúolos e que estes compartimentos ocupam mais ou menos 90% do volume total da célula. (Martinez *et al.*, 2005).

Há muitos estudos que tratam da nutrição de sódio no gênero *Atriplex*, mas geralmente consideram somente circunstâncias salinas (Mozafar e Goodin 1970; Matoh *et al.* 1989; Glenn *et al.* 1994,), supondo que a acumulação do sódio pode explicar inteiramente o ajustamento osmótico, somente se este elemento está disponível em quantidades elevadas no meio externo. A contribuição do sódio no ajustamento osmótico não é sempre direta, mas pode também ocorrer indiretamente: Subbarao *et al.* (2001) demonstrou que ele pode provocar a síntese de glicina betaína independentemente de algum estresse osmótico.

Investigando a ocorrência simultânea do estresse hídrico e salino em *Atriplex canescens*, Glenn & Brown (1998) concluíram que os efeitos de ambos os estresses, não são estritamente aditivos na redução da performance da planta e que a tolerância ambos os estresses está ligada a um mecanismo comum de absorção de  $\text{Na}^+$  para o ajustamento osmótico. Uma planta em solo seco é exposta a níveis crescentes de déficit de água e de estresse osmótico, porque o potencial matricial do solo diminui simultaneamente com a diminuição da umidade do solo. Mesmo se o ajustamento osmótico ocorrer, um decréscimo na condutividade hidráulica das membranas da raiz é observada e isso tem sido claramente demonstrado que o impacto do  $\text{Na}^+$  sobre o funcionamento dos canais de água, não é devido ao seu efeito osmótico (Carvajal *et al.*, 2000).

### 1.2.8 TOLERÂNCIA CRUZADA

Para sobreviver, as plantas utilizam vias e componentes comuns durante a resposta a vários tipos de estresses diferentes (Pastori & Foyer, 2002). Este fenômeno, conhecido por tolerância cruzada, permite à planta se adaptar/aclimatar a uma gama de estresses, após a exposição a um único estresse específico (Pastori & Foyer, 2002). Vale ressaltar que, aos mecanismos utilizados para responder os estresses ambientais, sob estas circunstâncias, é dado o nome de resposta cruzada (Knight & Knight, 2001). As respostas cruzadas ocorrem quando duas ou mais vias de sinalização, de estressores diferentes, convergem para um mesmo ponto, ou em vias de sinalização que interagem, interferindo nas respostas, uma das outras, para atingir objetivos diferentes (Singh *et al.*, 2002).

No caso da tolerância à seca e à salinidade, elas também podem ser obtidas através da manutenção, ativação ou promoção de sistemas fisiológicos comuns. Zhu (2002) propõe que, para sobreviver sob condições de estresse salino ou seca, o organismo vegetal utiliza três processos: (a) homeostase iônica e osmótica; (b) controle dos danos e reparo, ou desintoxicação; e (c) controle do crescimento. Assim, a sinalização durante os estresses hídrico e salino pode ser subdividida em três categorias funcionais: (a) sinalização do estresse iônico e osmótico para o restabelecimento da homeostase celular, sob condições de estresse; (b) sinalização da desintoxicação para o controle e reparo dos danos causados pelos estresses; e (c) sinalização para coordenar a expansão e divisão celular (Zhu, 2002).

O pré-condicionamento de plantas a determinados fatores de estresses constitui assim uma excelente ferramenta para a obtenção da tolerância a outros estresses abióticos como a seca e a salinidade em plantas (Maia, 2004).

## **2. HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### **2.1 HIPÓTESE GERAL**

O potencial osmótico de plantas de *Atriplex nummularia* sob estresse hídrico e salino é afetado pela influência significativa de determinados solutos orgânicos e inorgânicos.

### **2.2 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo geral à investigação de qual ou quais solutos orgânicos e inorgânicos são mais acumulados em condições de estresse hídrico e salino em folhas de *Atriplex nummularia*, bem como a contribuição relativa de cada um desses solutos para possíveis mudanças no potencial osmótico.

### **2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.3.1** Verificar o comportamento fisiológico dessas plantas sob doses crescentes de NaCl;

**2.3.2** Verificar o comportamento fisiológico dessas plantas em condições de deficiência hídrica;

**2.3.3** Quantificar os principais solutos orgânicos e inorgânicos acumulados em condições de estresse hídrico e salino;

**2.3.4** Analisar a participação relativa diferenciada de cada um dos solutos na osmolaridade total e no potencial osmótico em condições de estresse hídrico e salino;

**2.3.5** Verificar a influência do estresse hídrico e salino na osmolaridade total e no potencial osmótico dessas plantas;

**2.3.6** Avaliar se o pré-condicionamento dessas plantas com NaCl induz uma possível tolerância ao estresse hídrico;

**2.3.7** Avaliar se o pré-condicionamento dessas plantas com NaCl, influencia em uma acumulação diferenciada de solutos orgânicos e inorgânicos em condições de estresse hídrico;

**2.3.8** Analisar a influência do pré-condicionamento com NaCl nas possíveis mudanças na osmolaridade total e no potencial osmótico dessas plantas sob estresse hídrico.

## **2.4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL**

Para responder as questões acima mencionadas foram conduzidos três grandes experimentos seqüenciais. O primeiro experimento foi realizado com a imposição do estresse salino por doses crescentes de NaCl (0, 100, 200 ,300 ,400mM) em condições de casa de vegetação. O segundo experimento foi realizado pela imposição do estresse hídrico através de três ciclos consecutivos de seca/reidratação em condições de casa de vegetação. O terceiro experimento foi realizado pela imposição do estresse hídrico induzido por um agente osmótico (PEG 6000) em condições controladas de sala de crescimento (temperatura, umidade, luminosidade, fotoperíodo, etc).

### **3. CAPÍTULO 1- “Contribuição Relativa de Solutos Orgânicos e Inorgânicos no Potencial Osmótico de Plantas de *Atriplex nummularia* expostas a níveis crescentes de NaCl ”**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

A salinidade dos solos tem se constituído em um problema para a agricultura de regiões áridas e semi-áridas do mundo, limitando o crescimento e a produtividade das culturas e ocasionando enormes prejuízos sócio-econômicos (Gheyi, 2000; Munns, 2002). A ampliação da agricultura irrigada e o uso intensivo de águas de qualidade duvidosa, combinada com a alta taxa evaporativa, têm se chamado a atenção para o problema da salinidade no solo e na água do solo (Lambers, 2003). Numerosos estudos têm sido feitos para melhorar a tolerância das culturas agrícolas ao sal através de programas de melhoramento tradicional, porém sucessos comerciais têm sido muito limitados (Cuartero & Fernandez-Munoz, 1999).

Os efeitos da salinidade sobre as plantas tem sido foco de pesquisas nos últimos 100 anos, devido o estresse salino ser um dos principais fatores que limitam o crescimento e a produtividade das culturas. A tolerância á salinidade é um fenômeno complexo, que pode envolver alterações morfológicas, bem como processos fisiológicos e bioquímicos (Delauney & Verma, 1993; Hare & Cress, 1997).

As espécies vegetais diferem extensamente na resposta ao crescimento em condições de altas concentrações de sais, sendo extremamente importante à caracterização de mecanismos fisiológicos de tolerância ao sal. Esses mecanismos servem de base na seleção e melhoramento de plantas à salinidade (Koryo, 2003). O estresse iônico e osmótico causado pela salinidade pode resultar na restrição do crescimento vegetal. Eventos celulares como a compartimentalização de íons salinos e o ajustamento osmótico nas plantas tolerantes ao sal, pode permitir a manutenção do crescimento mesmo na presença de altas concentrações de sais no solo (Volkmar *et al.*, 1998).

Embora os mecanismos de tolerância à salinidade ainda não estejam bem conhecidos (Hasegawa et al., 2000), o acúmulo de íons inorgânicos e a síntese e acúmulo de solutos orgânicos compatíveis, tem sido considerados mecanismos ubíquos para o ajustamento osmótico celular de plantas sob condições de estresse salino (Strange, 2004). O relacionamento entre a osmorregulação e a tolerância ao sal não está esclarecido, existindo somente algumas evidências que o ajustamento osmótico, pode está envolvido com a tolerância ao estresse salino em algumas espécies vegetais (Richardson & McCree, 1985).

O ajustamento osmótico ou osmorregulação 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 (Taiz & Zeiger, 2004). Esse fenômeno é mantido pela acumulação 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: abertura estomática, fotossíntese, alongamento e divisão celulares (Serraj & Sinclair, 2002). O ajustamento osmótico representa, assim, um importante mecanismo de aclimatação das plantas às condições de seca ou de salinidade (Taiz & Zeiger, 2004).

Uma das características de muitas plantas cultivadas em ambientes salinos é a manutenção da turgescência pela acumulação de solutos inorgânicos em suas células, essas espécies de plantas são conhecidas como halófitas (Flowers et al., 1977). Assim, os íons salinos desempenham um importante papel na preservação do potencial hídrico vegetal. O armazenamento de íons salinos no vacúolo permite que a planta mantenha a turgescência sem desprendimento de energia para a síntese de solutos orgânicos (Martinoia et al., 1986).

Nas plantas que acumulam grandes quantidades de sais na célula, os íons salinos são estocados nos vacúolos, contribuindo assim para o ajustamento osmótico. Solutos orgânicos

induzidos pelo sal podem ter um importante papel na proteção celular e no ajustamento osmótico do citossol e das organelas. (Khan *et al.*,1998). Com isso, a habilidade das plantas se ajustar osmoticamente ao desbalanço iônico provocado pelo excesso de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas células, é muito importante na manutenção do crescimento.

Contudo, essa acumulação de íons salinos pode causar problemas de toxicidade iônica, deficiências nutricionais ou ambos (Greenway & Munns, 1980; Munns & Termat, 1986). Diversos trabalhos na literatura demonstram que a salinidade promove um aumento nos teores de sódio e cloreto, tanto em glicófitas (Greenway & Munns, 1980) como em halófitas (Flowers *et al.*, 1977). O aumento nas concentrações de  $\text{Na}^+$  com concomitante redução nas concentrações de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , aumenta excessivamente as relações  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$  no tecido vegetal em condições de estresse salino (Rogers & Noble, 1992; Ullah *et al.*, 1993).

Além de seu papel estritamente osmótico, a acumulação de solutos orgânicos pode auxiliar na estabilização das proteínas, complexos protéicos e membranas, bem como na manutenção das homeostase iônica e osmótica ou servirem como reserva de carbono e nitrogênio em condições adversas (Bohnert & Shen, 1999; Bray *et al.*, 2000). Adicionalmente, podem contribuir no controle do pH citosólico e na desintoxicação do excesso de  $\text{NH}_4$  (Gilbert *et al.*, 1998; Mansour, 2000). Modelos atuais sugerem que pequenas quantidades de solutos compatíveis também podem proteger as plantas removendo radicais livres de oxigênio gerados pelo estresse oxidativo secundário (Smirnoff & Cumbes, 1989; Zhu, 2002).

Entre os compostos orgânicos, os nitrogenados (aminoácidos, incluindo a prolina e compostos quaternários de amônio, dentre eles a glicina betaína) e os poliídrolícos (carboidratos e poliálcoois) são os solutos compatíveis mais comumente acumulados em plantas sob condições de estresse (Rabe, 1990; Ashraf & Harris, 2004). Nesse contexto, o acúmulo de aminoácidos e carboidratos solúveis tem sido estudado tanto em plantas sob condições de

estresse hídrico (Thakur & Rai, 1982; Tan et al., 1992; Bussis & Heineke, 1998) como de estresse salino (Rodriguez et al., 1997; Lacerda et al., 2003; Azevedo Neto et al., 2004), visto que são os solutos orgânicos de maior contribuição para o potencial osmótico.

A maioria do estresse salino sob as plantas é provocado pelos sais de sódio, particularmente o NaCl. Plantas que podem crescer na presença de altas concentrações de sais de sódio são chamadas de halófitas (Flowers & Yeo, 1987). As halófitas são tolerantes a salinidade, porque são abeis para absorver água nessas condições adversas, através da diminuição do potencial osmótico pela acumulação íons salinos (Bradley & Morris, 1991). Essas plantas são modelos viáveis de estudo dos mecanismos que elas usam para sobreviver em altas concentrações de sal, com o intuito de melhorar a tolerância de espécies vegetais não halófitas.

Muitas espécies do gênero *Atriplex* são enormemente adaptadas a ambientes de extrema salinidade, possuindo inúmeras características fisiológicas adaptativas (Martinez *et al.*, 2003), servindo de modelo para a identificação de mecanismos fisiológicos e genéticos envolvidos com a resistência a esses estresses abióticos (Wang & Showalter, 2004). Uma das características fisiológicas mais importantes de espécies de halófitas pertencentes ao gênero *Atriplex* é a enorme habilidade de acumular solutos orgânicos e inorgânicos com o intuito de se ajustar osmoticamente em condições de elevada salinidade (Martinez *et al.*, 2005).

Esse ajustamento osmótico das halófitas pode ser conseguido através da acumulação de íons salinos, como o sódio e o cloreto dentro do vacúolo ou também pela acumulação intensa de solutos orgânicos no citoplasma e organelas, dentre eles a glicina betaína e a prolina (Glenn & Brown, 1999). Dessa forma, verifica-se uma diminuição do potencial osmótico da planta, favorecendo a entrada e a manutenção de água nas células (Niu *et al.*, 1995). Já foi verificado que os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> podem contribuir para o ajustamento osmótico de células de folhas de plantas de *Atriplex nummularia* (Flowers *et al.*, 1977; Glenn & Brown, 1999; Ramos *et al.*, 2004; Araújo *et*

*al.*, 2006). Nos últimos anos, uma considerável atenção tem sido dada sobre o envolvimento do  $\text{Na}^+$  no ajustamento osmótico de espécies de halófitas. A implicação do  $\text{Na}^+$  no processo de ajustamento osmótico pode ser considerada, assumindo que este é principalmente presente nos vacúolos e que estes compartimentos ocupam mais ou menos 90% do volume total da célula. (Martinez *et al.*, 2005).

Embora os solutos inorgânicos e orgânicos desempenhem um importante papel no crescimento de 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 & 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.

Apesar das inúmeras pesquisas demonstrarem a importância da acumulação de solutos orgânicos e inorgânicos para o ajustamento osmótico de espécies de halófitas sob condições de extrema salinidade (Glenn & Brown, 1999; Ramos *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2005), poucos estudos existem na literatura sobre a contribuição relativa desses solutos no potencial osmótico e na osmolalidade total do tecido de plantas pertencentes ao gênero *Atriplex* sob estresse salino. Com isso, o objetivo principal deste trabalho foi tentar esclarecer, quais os solutos orgânicos e inorgânicos são mais acumulados em condições de estresse salino, usando como modelo de estudo a halófito *Atriplex nummularia*, investigando também a contribuição relativa desses solutos no potencial osmótico e na osmolalidade total das folhas dessas plantas em doses crescentes de NaCl.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar qual ou quais solutos inorgânicos e orgânicos são mais acumulados em condições de estresse salino, em folhas de *Atriplex nummularia*, bem como a contribuição relativa de cada um desses solutos para eventuais mudanças no potencial osmótico.

## **3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1 - Material vegetal**

Em toda fase experimental, foram utilizadas mudas de erva-sal (*Atriplex nummularia* Lindl.) que foram propagadas vegetativamente por estaquia, obtidas a partir de matrizes oriundas do campo. Na época do experimento as mudas tinham quatro meses de idade, sendo cultivadas em vasos de argila com capacidade de 3 L, contendo como substrato areia lavada de rio. O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação do Laboratório de Nutrição de Plantas e Estresse Ambiental – (LABPLANT) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

### **3.2.2 -- Local e condições do experimento**

O experimento foi desenvolvido em condições de casa de vegetação, do Laboratório de Nutrição de Plantas e Estresse Ambiental – (LABPLANT) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza-CE cuja localização é de latitude 3° 44' sul e longitude 38° 33' W e clima local do tipo AW na classificação de Koeppen. O período experimental foi compreendido entre os meses de Abril e Agosto de 2005. Durante o experimento as condições ambientais da época, no interior da casa de vegetação, foram: fotoperíodo de 12 horas de luz, temperaturas mínima 24°C, máxima 36°C, temperaturas médias diárias de 28°C, umidade relativa do ar mínima de 45%, máxima de 85%, médias diárias de 65% e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **3.2.3 Solução nutritiva**

Durante o experimento, foi utilizada a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada conforme a composição descrita na tabela 01.

Tabela 01: Composição da solução nutritiva utilizada na irrigação das plantas de *A. nummularia*.

Sais	[M]	(mL/L)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1	2,5
NH <sub>4</sub> Cl	1	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	0,5
MgSO <sub>4</sub>	1	0,5
KNO <sub>3</sub>	1	2,0
Fe – EDTA	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
	Na <sub>2</sub> (EDTA)	0,08
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,04	1
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,009	1
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,003	1
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,007	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0001	1

### 3.2.4 - Condução e tratamento das plantas

As mudas de *Atriplex nummularia*, com idade de quatro meses foram transplantadas diretamente para os vasos contendo areia (uma planta/vaso). Todos os vasos foram lavados exaustivamente com água destilada visando lixiviar o excesso de sais do substrato arenoso. Inicialmente as plantas foram submetidas a um período de aclimação durante 30 dias, onde nesta fase as mesmas foram irrigadas, com água destilada e solução nutritiva a cada dois dias intercalados, até próximo da capacidade de saturação do substrato (Araújo, 2003).

Após o período de aclimação, foram selecionadas 20 plantas homogêneas quanto ao tamanho, quando assim se iniciaram os tratamentos salinos. As plantas foram irrigadas a cada dois dias com aproximadamente 250 mL de solução de NaCl (100, 200, 300 e 400 mmol.L<sup>-1</sup>). O tratamento controle consistiu na substituição do NaCl por igual volume de água destilada. Semanalmente era monitorada a condutividade elétrica e pH do lixiviado dos vasos, quando as plantas atingiam concentrações próximas as nominais era realizada uma intensa lixiviação visando manter as plantas dentro das concentrações nominais, e assim evitar o acúmulo de sais. A cada semana as plantas eram irrigadas com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada.

### **3.2.5 – Colheita das plantas e determinação da massa fresca e massa seca**

Foi realizada uma única coleta aos 120 dias de tratamento salino. As plantas foram regularmente fotografadas com o objetivo de registrar os sintomas visuais do estresse e/ou quaisquer outras modificações morfológicas na parte aérea das plantas. Foi feita pesagem da massa fresca das folhas, e posteriormente transferidas para secagem em estufa com circulação de ar quente a 70 °C durante 48 horas, sendo pesados novamente para determinação da massa seca.

### **3.2.6 – Determinações analíticas**

#### **3.2.6.1 - Conteúdo relativo de água (CRA), Umidade e Suculência foliar**

O conteúdo relativo de água foi determinado segundo Slavick (1974). Na coleta foram retirados 30 discos foliares de 10 mm de diâmetro, onde posteriormente foi determinada a massa fresca dos mesmos ( $MF_1$ ), em balança analítica. Após os discos foliares foram transferidos para placa de petri, contendo água destilada e deixados sobre uma bancada por período de 6 horas. Depois os discos foram removidos e colocados entre folhas de papel de filtro e submetidos a uma pressão, visando eliminar o excesso de água, em seguida foram pesados novamente ( $MF_2$ ). Em seguida, foram colocados em sacos de papel, para secar em estufa (75°C) por um período de 48 horas, para depois ser determinada a massa seca do material ( $MS$ ). O conteúdo relativo de água das folhas foi calculado, usando a relação descrita por Irigoyen et al., (1992):

$$CRA = (MF_1 - MS / MF_2 - MS) \times 100 (\%)$$

A umidade das folhas foi determinada segundo Slavik (1974), utilizando-se a seguinte relação:

$$UMIDADE = (MF_1 - MS) / (MF_1) \times 100 (\%)$$

A suculência foliar foi calculada usando a equação:

$SUCULÊNCIA = (MF_1) / (A)$ . Onde ( $A$ ) representa a área de 30 discos cujo diâmetro é de 10 mm. Sendo expressa em  $mg\ MF\ cm^{-2}$ .

#### **3.2.6.2 - Integridade das membranas (vazamento de eletrólitos)**

O grau de integridade das membranas foi estimado pelo vazamento de eletrólitos segundo Lutts *et al* (1996), com pequenas modificações. Foram coletados dez discos foliares com diâmetro de 10mm de cada repetição sendo estes colocados em tubos de ensaio com 10mL de

água deionizada e incubados em banho maria à temperatura de 25°C durante 6 horas. Em seguida, o extrato de incubação foi analisado em fotômetro de chama (Micronal B462) para determinação da leitura de  $K^+$  ( $L_1$ ) a 25°C. O vazamento de eletrólitos (%DM) foi estimado pelo quociente entre a quantidade de potássio vazada e a massa dos discos foliares incubados, sendo expressa em  $\mu\text{mol } K^+ \text{ g}^{-1}\text{MF}$ .

#### **3.2.6.3 – Determinação do teor de cinzas**

0,5 g de massa seca de folhas foram colocados em cadinhos de porcelana de peso conhecido e incinerados em mufla à temperatura de 550°C durante 5 horas, fazendo-se em seguida uma nova pesagem para determinação do peso total de cinzas.

#### **3.2.6.4 – Determinação da concentração de sódio e potássio**

A concentração de sódio e potássio foi realizada segundo Sarruge & Haag (1974) com algumas modificações. A extração de sódio e potássio em farinha de folhas foi feita utilizando 50 mg de tecido vegetal para 20 mL de  $H_2O$  deionizada em banho-maria a 100 °C por 1 hora (Amzallag *et al.*, 1990). O extrato obtido foi centrifugado e seu sobrenadante foi analisado em fotômetro de chama (Micronal B462) para determinação dos conteúdos de  $Na^+$  e  $K^+$ .

#### **3.2.6.5 – Determinação da concentração de cloreto**

A concentração de cloreto foi determinada segundo Malavolta *et al.*, (1997). Tecidos de folhas (100 mg) foram submetidos à extração com 25 mL de água deionizada com agitação ocasional durante 30 minutos. Em seguida alíquotas de 20 mL do extrato foram filtradas em papel de filtro e adicionadas 1 mL da solução indicadora de cromato de potássio  $K_2CrO_4$  5% (p/V). Cada amostra foi titulada lentamente com nitrato de prata  $AgNO_3$  28 mM em bureta automática até a viragem do indicador através da formação do precipitado de  $Ag_2CrO_4$  (coloração marrom pálido persistente). Cada 1 mL de nitrato de prata gasto na titulação correspondeu a 2,5 mg de cloreto em 100 mg de matéria seca. Foi utilizado um branco com 20 mL de água deionizada + indicador + algumas gotas de  $Ag_2NO_3$  até obtenção da coloração marrom pálido. O volume do branco foi subtraído de cada amostra.

### **3.2.6.6 – Determinação da concentração de cálcio e magnésio**

Para a determinação do teor de cálcio e magnésio foi realizada uma digestão branda preconizada por Miyazawa *et al.*, (1984). Foram pesados 500 mg de massa seca de folhas, previamente seca em estufa, e foram transferidas para erlenmayer de 50 mL e adicionado 25 mL de uma solução 1N de HCl e colocadas em agitação por 1 hora, e depois foram filtradas e completadas o volume para 50 mL.

Procedida a extração branda, seguiu-se a marcha analítica da quelatometria do EDTA desenvolvida por Malavolta *et al.*, (1997). As amostras passaram por um processo de eliminação do ânion fosfato, logo em seguida foram tituladas com uma solução 0,01 M de ácido etileno diamino tetracético dissódico (EDTA) até a obtenção de cor azul estável. Sendo que para determinação do cálcio foi utilizado como indicador o eriocromo azul negro R (Calcon) a 1%(m/v). E para determinação do cálcio+magnésio foi utilizado como indicador negro de eriocromo T, a partir da subtração do cálcio obtem-se o teor de magnésio. Foi utilizado um branco que foi subtraído de cada amostra.

### **3.2.6.7 – Determinação do teor de nitrato**

Amostras de 50 mg de folhas previamente liofilizadas, foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de água destilada, e estes incubados em banho-maria por 30 minutos a 100 °C. Em seguida foi feita uma filtragem para obtenção do extrato. O método utilizado foi o de **Cataldo et al., (1975)**, a reação foi preparada em tubo de ensaio contendo 100 µL do extrato + 200 µL de solução de ácido salicílico 5 % (p/v), em ácido sulfúrico concentrado. Após vigorosa agitação em agitador do tipo vortex, os tubos foram adicionados lentamente 4700 µL de NaOH 2 N. Em seguida os tubos foram deixados em repouso até atingirem a temperatura ambiente por cerca de 20 minutos. Após foram feitas leituras em espectrofotômetro na absorvância de 410 nm. O branco foi feito usando no ensaio água deionizada em substituição ao extrato. A concentração de nitrato foi obtida a partir de uma curva padrão com concentrações crescentes de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 µmol mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em mmol de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kg<sup>-1</sup> MS de tecido.

### **3.2.6.8 – Determinação da concentração de fosfato e sulfato**

O teor de fosfato e sulfato foi obtido segundo Malavolta *et al.*, (1997). A extração foi feita com a pesagem de 200mg de material liofilizado de folhas colocados em tubos de ensaio, onde foi adicionado 25mL de ácido acético 2% (v/v). Após foi feita três agitações com

aproximadamente 30s cada agitação em cada tubo, para em seguida ser realizada uma filtração em papel de filtro.

A determinação da concentração de fosfato foi feita pelo método da calorimetria do azul de molibdênio (fósforo solúvel em ácido acético) segundo Malavolta *et al.*, (1997). No ensaio, alíquotas de 2mL do filtrado foram adicionadas em erlenmayer de 125mL, contendo 95 mL de água deionizada. Após foi adicionado em cada erlenmayer 4,0mL da solução de molibdato de amônio 2,5% e 4 gotas da solução redutora de estanho ( 1g estanho metálico: 20mL HCl concentrado: 4 gotas de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4% m/v). Após a homogeneização as amostras serão deixadas em repouso por 8 minutos e em seguida lidas em espectrofotômetro na absorvância de 580nm. Para o cálculo do teor de fosfato nas amostras foi utilizada uma curva padrão a partir de concentrações crescentes de fosfato (0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05  $\text{mg PO}_4 \text{ mL}^{-1}$ ).

A determinação da concentração de sulfato foi feita pelo método turbidimetria do sulfato de bário segundo Malavolta *et al.*, (1997). No ensaio, alíquotas de 10mL do filtrado foram colocadas em tubos de ensaio, onde foi adicionado 1mL de HCl 6N (contendo 20ppm de S). Após foi adicionado 500mg de cristais de cloreto de Bário ( $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), deixando um minuto sem agitação para dissolução. Em seguida, foi feita uma agitação em cada tubo de ensaio de 30 segundos, deixando posteriormente em repouso por cerca de 3 minutos. É recomendado fazer o ensaio de até 11 amostras simultaneamente, atingindo um tempo total de cerca de 8 minutos desde a adição dos cristais de bário no branco. Após o repouso foram feitas leituras em espectrofotômetro na absorvância de 420 nm. Para o cálculo do teor de sulfato nas amostras foi utilizada uma curva padrão a partir de concentrações crescentes de sulfato (0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 50  $\mu\text{g SO}_4 \text{ mL}^{-1}$ ).

### **3.2.6.9 - Açúcares solúveis totais**

Amostras de 50mg de folhas liofilizadas foram colocadas em tubos de ensaio com 5mL de água deionizada, fechados hermeticamente e incubados em banho-maria a 100°C, durante 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 6.000 x g, por 10 minutos. Após a extração o sobrenadante foi coletado e desenvolvido a reação para dosagem dos açúcares solúveis totais. A dosagem foi feita espectrofotometricamente pelo método “fenol-sulfúrico”, descrito por Dubois et al., 1956.

### **3.2.6.10 - Determinação de aminoácidos livres totais (N- $\alpha$ -amino livre)**

A concentração de aminoácidos livres totais (AALT) foi determinada segundo método descrito por Peoples *et al.* (1989) com algumas modificações feitas por Brilhante (2003). Farinhas de tecido vegetal liofilizado de folhas e raízes (50mg) foram colocadas em tubos de ensaio com 5mL de água deionizada, fechados hermeticamente e incubados em banho-maria a 100°C, durante 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 6.000 x g, por 10 minutos.

Após a extração o sobrenadante foi coletado e desenvolvido a reação para dosagem dos aminoácidos. Aliquotas de 0,1 mL do extrato foram colocadas em tubos de ensaio e acrescidas de 0,4 mL de água mille-Q. Em seguida 0,250mL de uma solução tamponada, pH 5,0, contendo 0,2 mol.L<sup>-1</sup> de citrato; 0,250mL do reagente de ninhidrina (KCN 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> e ninhidrina 5% em methoxy etanol) foi adicionado. Após misturar bem em vortex os tubos foram hermeticamente fechados e colocados em banho-maria, onde permaneceram pelo tempo de 15 minutos à temperatura de 100° C.

Em seguida, a reação foi interrompida em banho de gelo, momento em que foi adicionado 1,5 mL de uma solução de etanol 50% (V/V). Após os tubos permanecerem por 20 minutos em temperatura ambiente e em seguida, feita leituras em espectrofotômetro, a 570nm, sendo os teores de aminoácidos livres totais, determinado com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de uma mistura padronizada de L – glutamina.

### **3.2.6.11 - Concentração de proteínas solúveis**

Amostras de 50mg de folhas liofilizadas foram incubadas com 1,5mL de uma solução tampão (Tris-HCl 25mol m<sup>-3</sup> pH 7,6) e submetidas à extração em agitador horizontal durante 2 horas. Em seguida, foram centrifugados a 15000 x g por 15 minutos, a 4°C, em centrífuga refrigerada de mesa. Após, foi coletado o sobrenadante e determinada a concentração de proteínas solúveis segundo o método descrito por Bradford (1976). Aliquotas de 0.1mL foram coletadas do extrato e 2.5mL do reagente de Bradford adicionados. Após 15 minutos em temperatura ambiente foram feitas leituras em espectrofotômetro, a 595nm. A concentração de proteínas solúveis foi calculada com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de albumina soro bovino (BSA) p.a. (SIGMA).

### **3.2.6.12 - Determinação do teor de prolina livre**

Foi determinado segundo método descrito por (Bates, 1973). Amostras de 50mg de folhas liofilizadas foram incubados em tubos de ensaio com 5 mL de água destilada, fechados hermeticamente e levados ao banho maria por 30 minutos a 90°C. Em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 8.000 x g, coletado o sobrenadante e completado o volume para 5mL, com água destilada. Após essa etapa, alíquotas de 1mL do extrato foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1mL de ninhidrina ácida (1g do reagente de ninhidrina em 24 mL de ácido acético glacial p.a. e 16mL de ácido fosfórico 6 mol.L<sup>-1</sup>) e 1mL ácido acético glacial concentrado.

Após homogeneização, os tubos, hermeticamente fechados, foram levados ao banho maria a 100°C, por 1 hora. Em seguida, a reação foi interrompida por redução da temperatura com banho de gelo para 2°C, momento em que foi adicionado 2mL de tolueno p.a., ao meio de reação. Após agitação por aproximadamente 15 segundos duas fases foram formadas. A fase aquosa superior e de coloração avermelhada (cormóforo + tolueno) foi recuperada e submetida à leitura em espectrofotômetro, a 520nm. Os teores de prolina livre foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de L-prolina p.a. (Sigma)

### **3.2.6.13 – Determinação de glicina betaína**

Os compostos quaternários de amônio (QACs) foram extraídos e mensurados como equivalentes a GB de acordo com Grieve & Grattan (1983). Amostras de farinha liofilizada de folhas foram adicionadas a 20mL de água deionizada e colocadas em shaker sob agitação por 24h a 25°C. O extrato foi filtrado e depois de diluído (1:1) com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Alíquotas de 0,5mL foram colocadas em tubos de centrífuga e colocados em banho de gelo por 1h. Foi adicionado 0,20 mL do reagente frio ( KI-I<sub>2</sub>) . Os tubos foram guardados a 4°C por 16h e após centrifugados a 10000 rpm por 15 min à 0 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e os cristais periódicos foram dissolvidos em 9,0 mL de 1,2 dicloroetano e misturado vigorosamente. Após 2h a absorbância foi mensurada a 365 nm. Uma curva padrão de GB (50-200 µg/ml) foi preparada em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Os resultados forma expressos em mmol GB kg<sup>-1</sup>MS.

#### **3.2.6.14 - Osmolalidade total, Potencial osmótico e Ajustamento osmótico**

A determinação da osmolalidade total do tecido foliar foi baseada na metodologia descrita por Martinez *et al.*, 2005. Dez folhas foram destacadas do terço médio da parte aérea da planta e maceradas em almofariz com pistilo. Após a maceração, a seiva obtida do tecido foi filtrada e centrifugada a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C para obtenção do extrato. Uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi utilizada para determinação da osmolalidade total do tecido usando um osmômetro de pressão de vapor (modelo Wescor 5520). Os valores obtidos em (mmol kg<sup>-1</sup>) foram convertidos em potencial osmótico usando a relação (1mmol kg<sup>-1</sup> = 2.408 k Pa) segundo Santa Cruz *et al.*, 2002. O ajustamento osmótico (OA) foi calculado pela diferença entre o potencial osmótico das plantas estressadas e das plantas controle, segundo Moghaieb *et al.*, 2004.

#### **3.2.6.15 - Contribuição relativa de solutos inorgânicos e orgânicos para o potencial osmótico das folhas**

A contribuição relativa de cada um dos solutos inorgânicos e orgânicos para o potencial osmótico foi obtida através da divisão entre a quantidade acumulada de cada um dos solutos (com base na umidade do tecido) pela osmolalidade total do tecido (mmol Kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O do tecido), sendo depois multiplicado por cem (%).

#### **3.2.7 - Delineamento experimental e análises dos resultados**

Os tratamentos foram distribuídos de acordo com um delineamento inteiramente casualizado, obedecendo a um esquema (5 x 4), correspondendo respectivamente a cinco níveis de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400 mmol.L<sup>-1</sup>) e quatro repetições, sendo cada parcela experimental representada por um vaso contendo uma planta, perfazendo um total de 20 parcelas experimentais. Os resultados foram analisados estatisticamente com base na análise de tendência das médias através de curvas ajustadas por regressão linear e polinomial.

### 3.3 RESULTADOS

As plantas de *Atriplex nummularia* atingiram ao final do experimento com doses crescentes de NaCl, exatamente nove meses de idade (quatro meses de idade, um mês de aclimação nos recipientes de argila dentro de casa de vegetação e quatro meses de aplicação dos tratamentos salinos). O estande de plantas apresentou certa homogeneidade, isso aos 60 dias de aplicação dos tratamentos, conforme mostra a (Figura 1). Entretanto, na época da colheita das plantas, a parte aérea das plantas apresentou diferenças morfológicas nas folhas, por efeito dos tratamentos com NaCl. (Figura 2).

As plantas de *Atriplex nummularia* apresentaram uma tendência de aumento na massa seca das folhas com o tratamento salino, quando comparado com as plantas crescidas na ausência de NaCl. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre as doses de NaCl testadas, sendo essas apenas diferentes das plantas tratadas na ausência de sal. A massa seca das folhas, na dose mais elevada de sal (400 mM), foi cerca de duas vezes maior que o controle, revelando assim o caráter acumulador de sais desta espécie de halófita (Figura 3A). Quanto aos teores de cinzas, como era de se esperar, houve um incremento substancial destes teores com o aumento das doses de sal, sendo uma variação na ordem de quase três vezes, os valores encontrados nas plantas controle (1,26) contra (3,44) das plantas tratadas com 400 Mm de NaCl (Figura 3B). Com relação à massa orgânica seca (MOS) das folhas, que seria a massa seca livre de cinzas, foi observado um incremento desta com aumento das doses de NaCl (Figura 3C), demonstrando assim que o sal estimulou o acúmulo de massa seca orgânica nas folhas das plantas de *Atriplex nummularia*.

Com relação ao *status* hídrico das folhas das plantas de *A. nummularia*, observou-se uma tendência de aumento no conteúdo relativo de água (CRA), quando se compara as plantas tratadas com NaCl e as plantas controle (Figura 4A). A mesma tendência de aumento foi observada também pela umidade foliar das folhas das plantas crescidas com sal em relação às plantas crescidas na ausência de sal (Figura 4B). A suculência foliar teve incrementos consideráveis, variando de 43,17 para as plantas controle, para 58,87 nas plantas tratadas com a dose mais elevada de NaCl (400 mM), apresentando um aumento linear com as doses crescentes de sal (Figura 4C). Isso mostra assim, a capacidade das folhas em se manterem tenras com um bom *status* hídrico, favorecendo assim o crescimento desta planta mesmo em condições de

salinidade elevada, como no caso da dose de 400 mM de NaCl. Essa tendência de aumento na suculência das folhas observado neste experimento, foi corroborado com os aspectos morfológicos apresentados pelas folhas com a elevação das doses de NaCl (Figura 2).

As plantas de *A. nummularia* tratadas com NaCl, apresentaram uma intensa acumulação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas folhas, mostrando diferenças significativas quando comparado com as plantas controle (Figura 5A e 5B). O teor de  $\text{K}^+$  nas folhas teve uma tendência de decréscimo significativo com o aumento das doses de NaCl (Figura 5C). Os teores de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  também diminuíram com o aumento da salinidade, sendo que o teor de  $\text{Mg}^{2+}$  a redução foi cerca de 60% o valor do controle, enquanto o teor de  $\text{Ca}^{2+}$  a redução foi bem maior, cerca de 80% o valor do controle (Figura 6A e 6B). Os teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  das folhas das plantas tratadas com concentrações crescentes de NaCl, tiveram uma tendência de decréscimo semelhante à observada para os teores de  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  comparando com as plantas controle (Figura 7A, 7B e 7C). No caso dos teores de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  das folhas das plantas crescidas com sal, houve uma redução de 50% dos valores observados nas plantas controle (Figura 7B e 7C), enquanto que o teor de  $\text{NO}_3^-$  foi reduzido de maneira mais marcante, sendo aproximadamente 75% o valor observado no controle (Figura 7A).

Em relação aos conteúdos de solutos orgânicos encontrados nas folhas das plantas de *A. nummularia* após os quatro meses de tratamento com doses crescentes de NaCl, foi observado uma tendência significativa de decréscimo no conteúdo das proteínas solúveis e aminoácidos livres (Figura 8B e 8C). Sendo que nas proteínas solúveis esse decréscimo observado nas plantas tratadas com NaCl, foi bem mais acentuada, chegando a ser linear, onde o conteúdo de proteínas solúveis variou de 11,87 nas plantas controle para 4,97 nas plantas tratadas com a dose mais elevada de NaCl (400 mM), ou seja, em torno de 2,3 vezes menos proteínas solúveis (Figura 8B). Porém, o mesmo não foi visto com o conteúdo de açúcares solúveis nas folhas, que permaneceram inalterados com o tratamento salino (Figura 8A).

Houve uma redução no conteúdo de prolina livre nas folhas das plantas crescidas na presença de sal, cerca de 50% do valor observado nas plantas controle após quatro meses de tratamento (Figura 9A). O percentual de prolina em relação ao *pool* de aminoácido livre totais foi extremamente baixo, chegando a no máximo 1,2 % nas plantas controle e reduzindo a 0,75 % nas plantas tratadas com 400 mM de NaCl (Figura 9B). Entretanto, o conteúdo de glicina betaína das

folhas não foi reduzido nas doses mais baixas de sal (100 e 200 mM de NaCl), sendo somente reduzidos significavelmente nas plantas tratadas com 300 e 400 mM de NaCl (Figura 9C).

O tratamento com NaCl, provocou um aumento significativo na osmolalidade das folhas de *Atriplex nummularia* após quatro meses de tratamento, chegando a valores 2 vezes maiores que os das plantas não tratadas com NaCl (Figura 10A). O aumento da osmolalidade total das folhas com o tratamento salino foi acompanhado por um decréscimo no potencial osmótico desse órgão, chegando a um valor aproximado de -5,20 MPa na dose mais elevada de NaCl (400 mM) (Figura 10B). Não houve diferença estatística significativa nos valores do potencial osmótico das folhas entre as doses de NaCl analisadas neste experimento (Figura 10B). O ajustamento osmótico das folhas (AO), estimado através da diferença entre o potencial osmótico das plantas tratadas com NaCl e o das plantas não tratadas com NaCl, foi significavelmente aumentado com a salinidade (Figura 10C).

A contribuição relativa dos solutos inorgânicos para o ajustamento osmótico das folhas de *Atriplex nummularia* em condições de alta salinidade é mostrada na tabela 1. Foi verificado que os íons salinos,  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$ , mostraram uma tendência de aumento na sua contribuição relativa com tratamento salino (Figura 11A e Tabela 2). Entretanto os demais solutos inorgânicos analisados ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), tiveram um decréscimo significativo no percentual de contribuição para a osmolalidade total das folhas com o tratamento salino (Figura 11A e Tabela 2).

A maior parte da acumulação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  observada nas folhas das plantas não tratadas com NaCl, se deve a alta afinidade dessas células para íons salinos, especialmente para  $\text{Na}^+$  (32%) contra 20% do ( $\text{Cl}^-$ ), em termos da contribuição relativa para a osmolalidade total da folha. Em termos quantitativos, o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  foram os íons que mais contribuíram para o ajustamento osmótico das folhas de *Atriplex nummularia* com a salinidade, chegando a aproximadamente 40% e 38% da osmolalidade total das folhas, respectivamente, na dose de 400 mM de NaCl (Tabela 2).

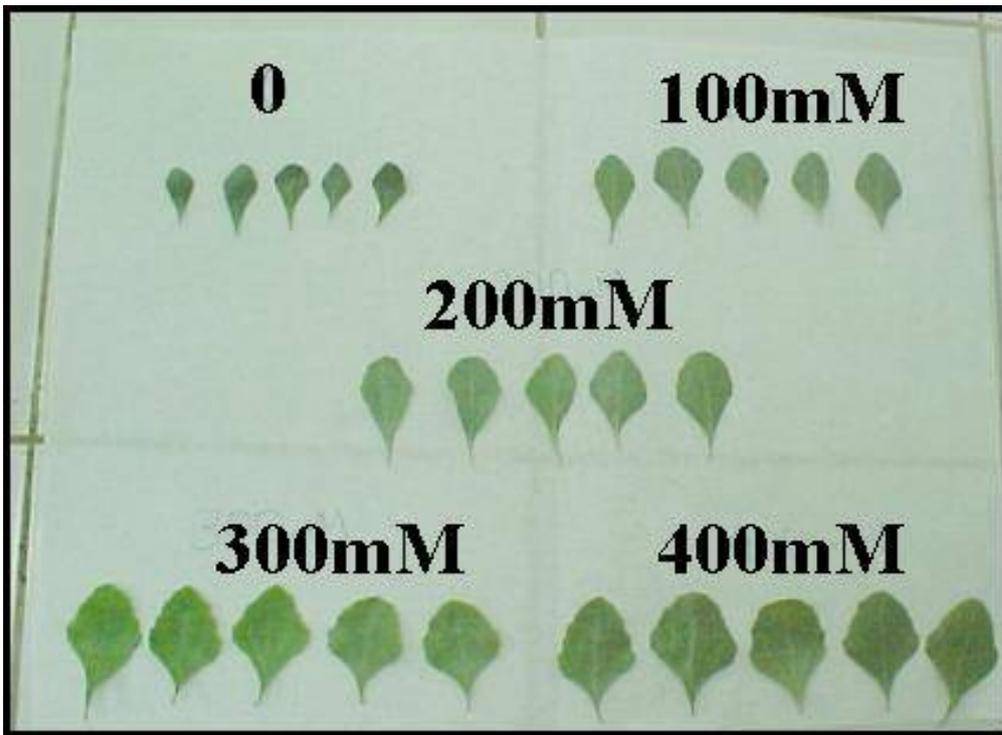
Seguido dos íons salinos, o  $\text{K}^+$  foi o soluto inorgânico que mais contribuiu relativamente para osmolalidade total das folhas, porém mostrou um decréscimo significativo com a salinidade, variando de 16% nas plantas não tratadas com NaCl, para aproximadamente 6% na plantas tratadas com NaCl (Tabela 2). Os cátions  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  foram os que mais contribuíram relativamente para o ajustamento osmótico das folhas, variando de 6% e 5%,

respectivamente, nas plantas controle para 0,78% e 1,30% nas plantas tratadas com sal (Tabela 2). A contribuição relativa de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  para o ajustamento osmótico das folhas das plantas tratadas com NaCl foi muito baixa, menor que 1% da osmolalidade total (Tabela 2).

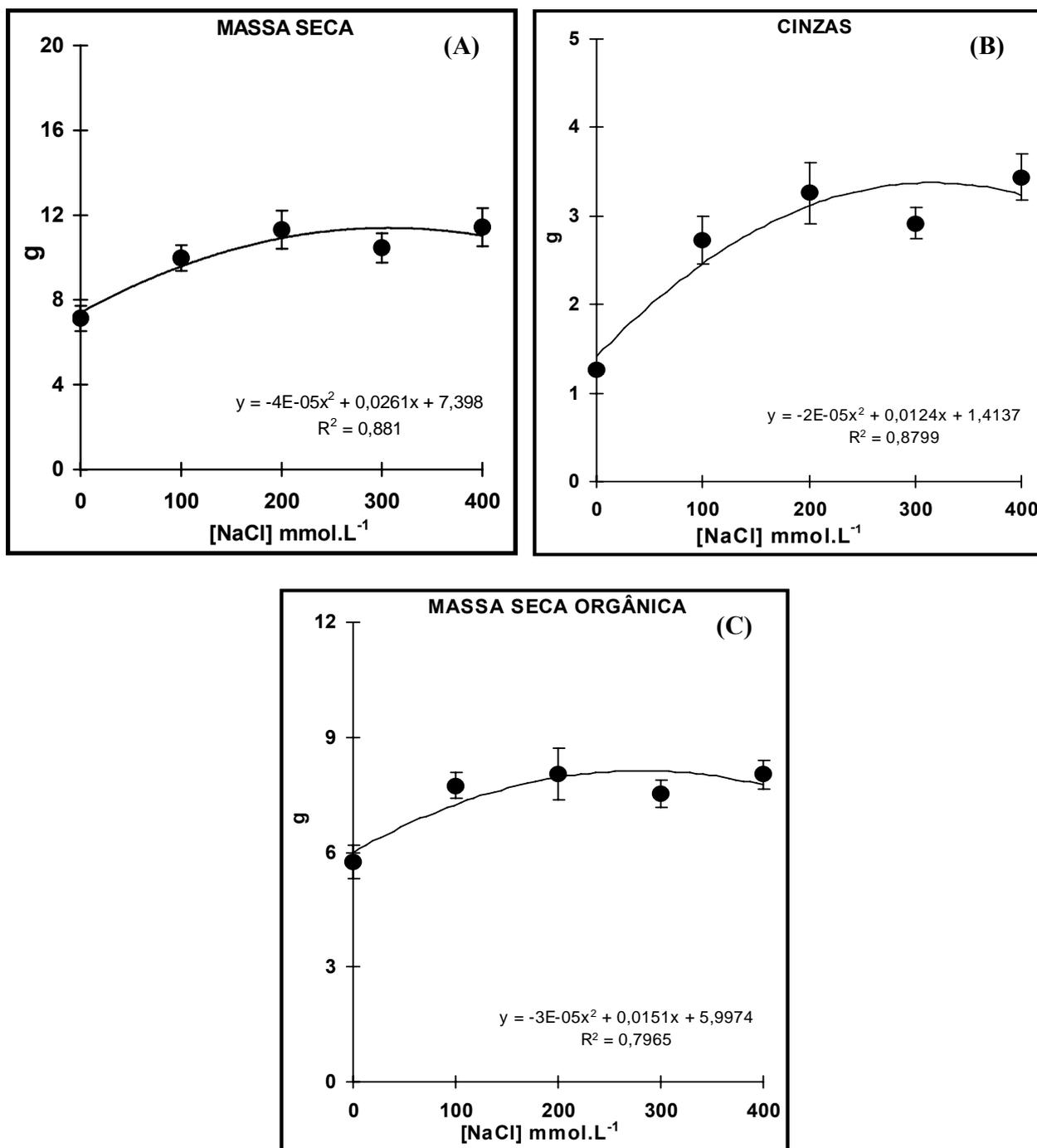
Com relação à contribuição relativa de solutos orgânicos para o ajustamento osmótico das folhas de *Atriplex nummularia* sob doses crescentes de NaCl, foi visto que a contribuição da glicina betaína (GB) foi maior que as dos demais solutos orgânicos analisados, cerca de 6% da osmolalidade total, nas plantas tratadas com sal (Tabela 3). Assumindo que a GB está confinada no citosol da célula, que representa cerca de 10% do volume total da célula, essa contribuição efetiva para o ajustamento osmótico citosólico pode ser 10 vezes maior. A contribuição relativa dos açúcares solúveis (3,5%), aminoácidos livres (0,7%) e de prolina (0,006%) para o ajustamento das folhas tratadas com NaCl, foi menos importante (Tabela 3). Interessantemente, a contribuição relativa de todos os solutos orgânicos analisados para o ajustamento osmótico das folhas na presença de NaCl, decresceu significativamente (Figura 11B e Tabela 3).



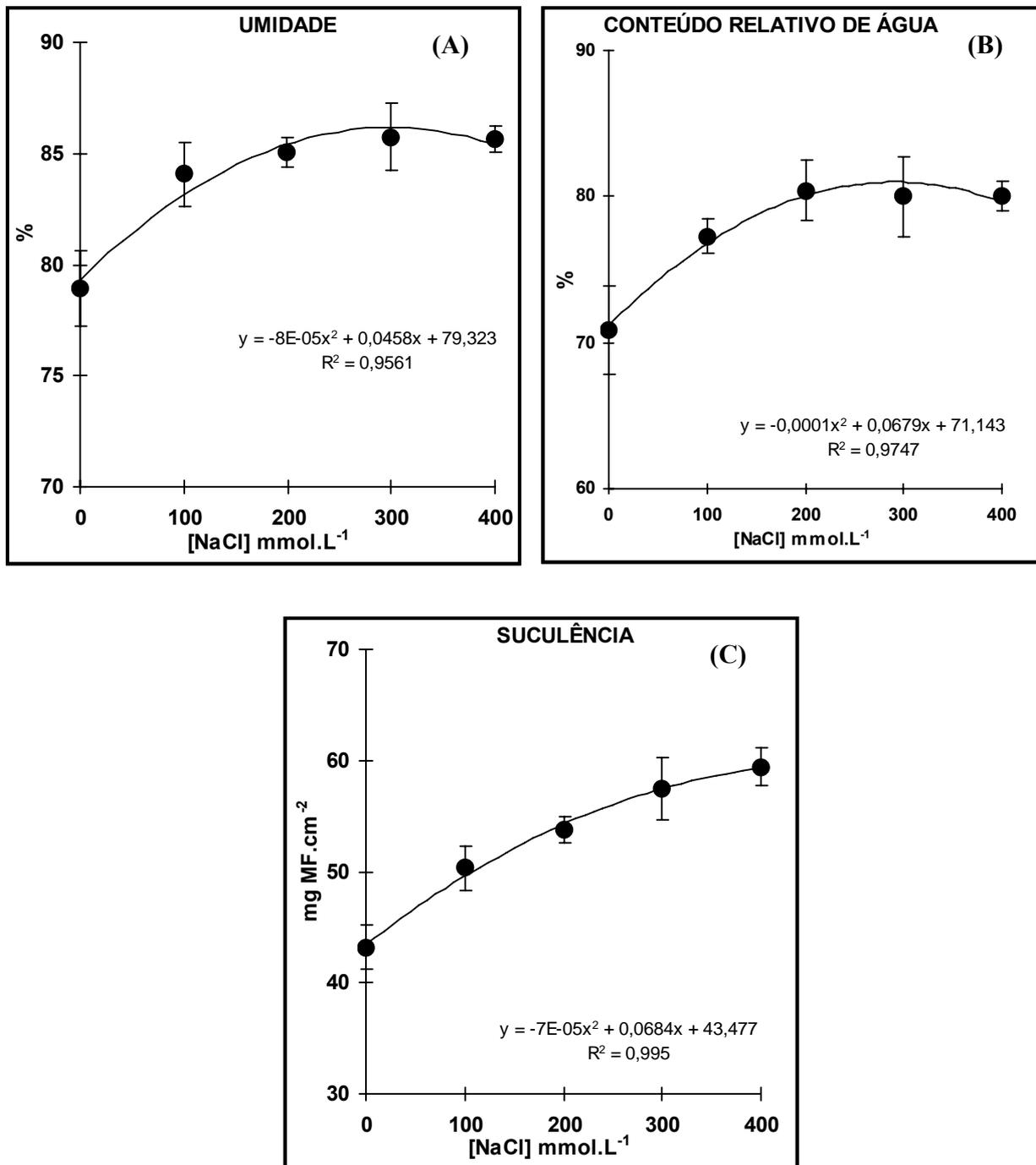
**Figura 1** – Aspecto visual do stand de plantas de *Atriplex nummularia* após 60 dias de tratamento com doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM)



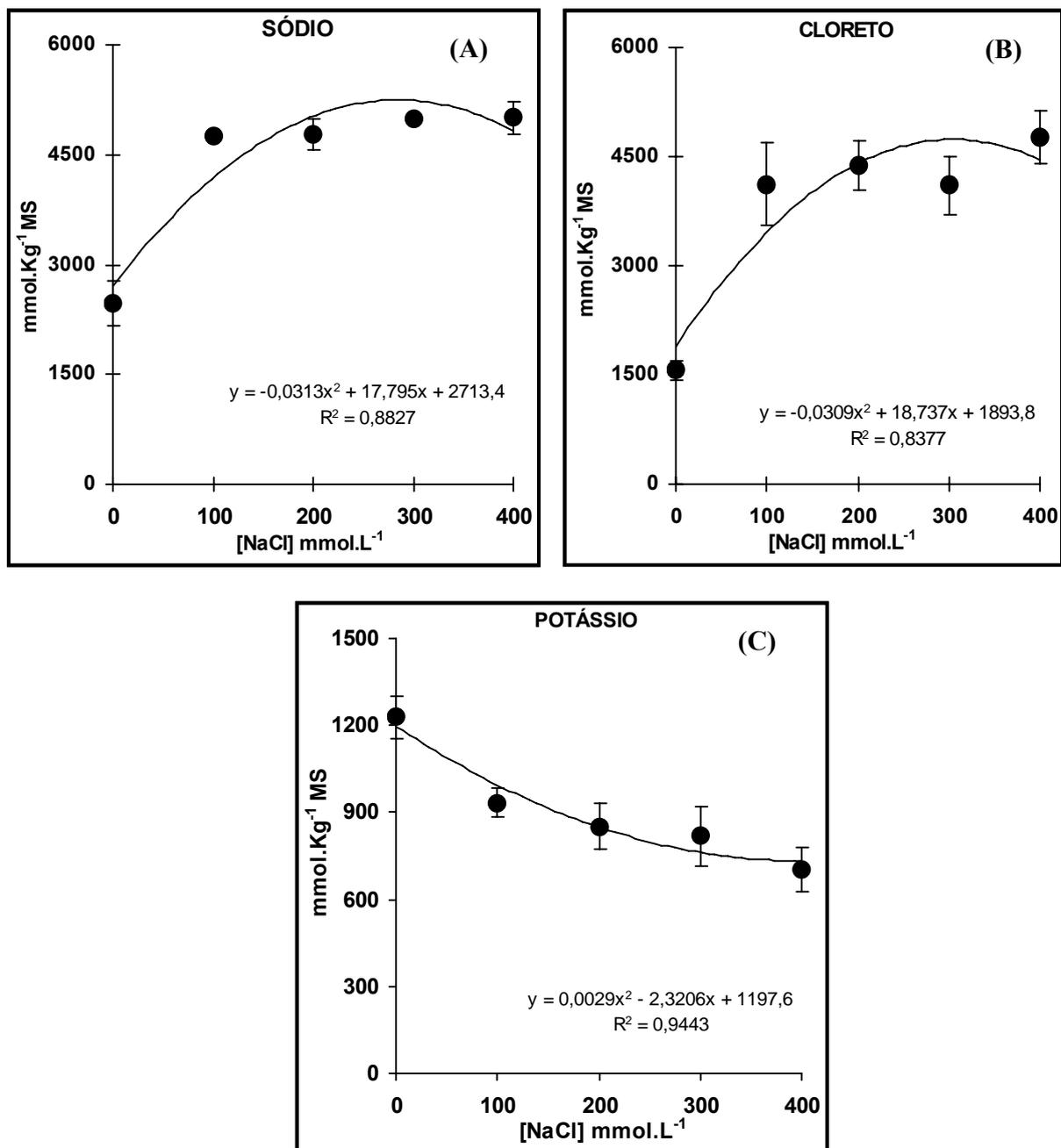
**Figura 2** – Stand de plantas e aspecto morfológico das folhas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) após o período de 120 dias de tratamento.



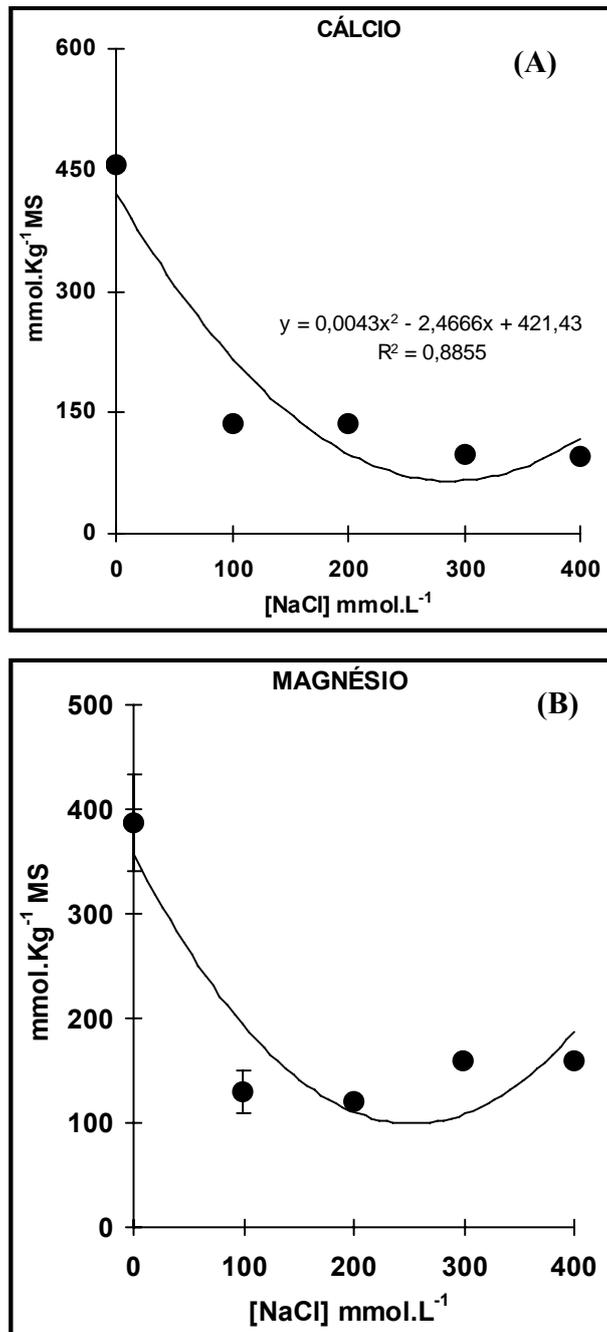
**FIGURA 03** – Massa seca (A), cinzas (B) e massa seca orgânica (C) das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.



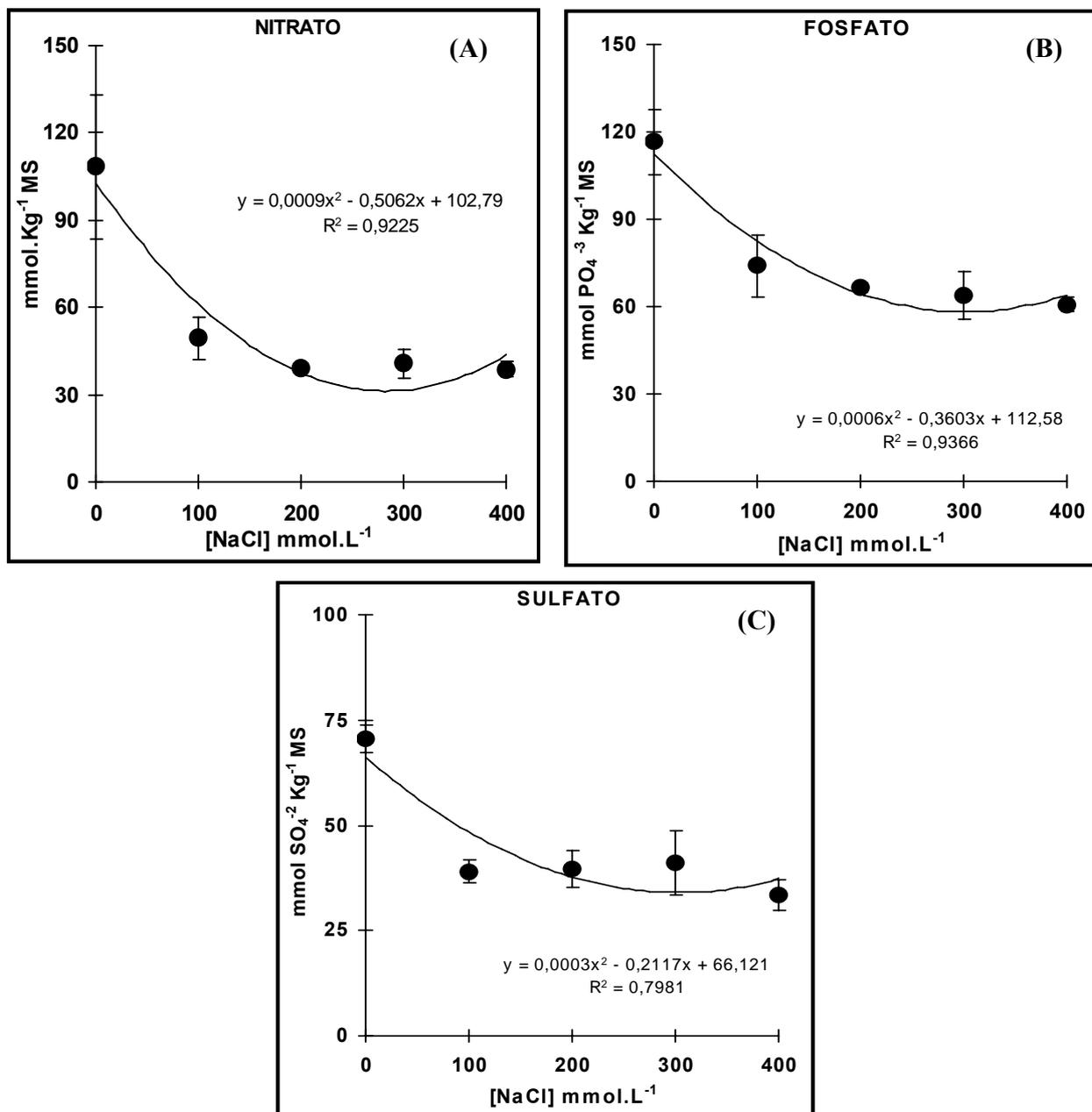
**FIGURA 04** – Variação na umidade (A), Conteúdo relativo de água (B) e suculência (C) das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.



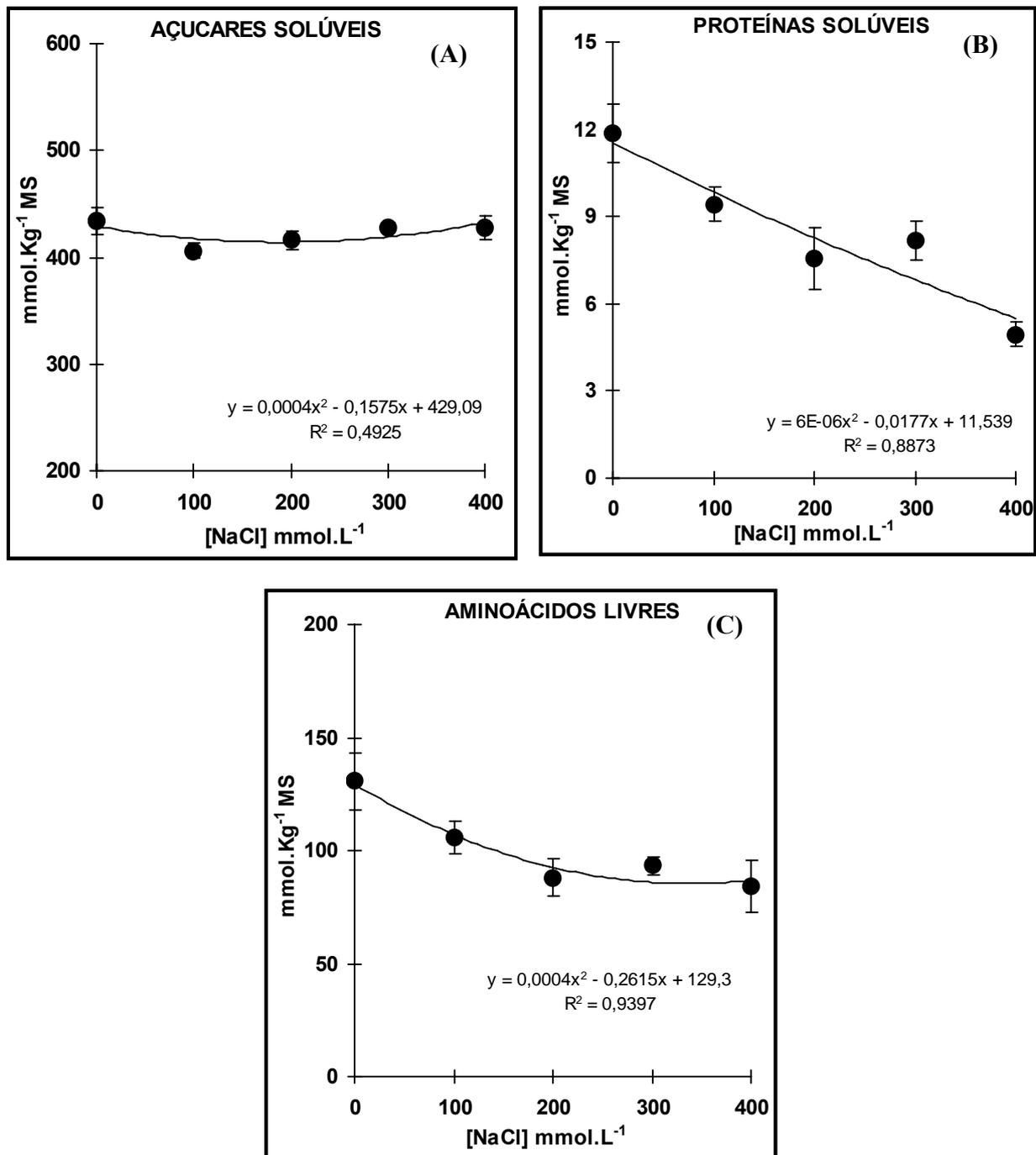
**FIGURA 05** – Variação no conteúdo de sódio (A), cloreto (B) e potássio (C) total das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.



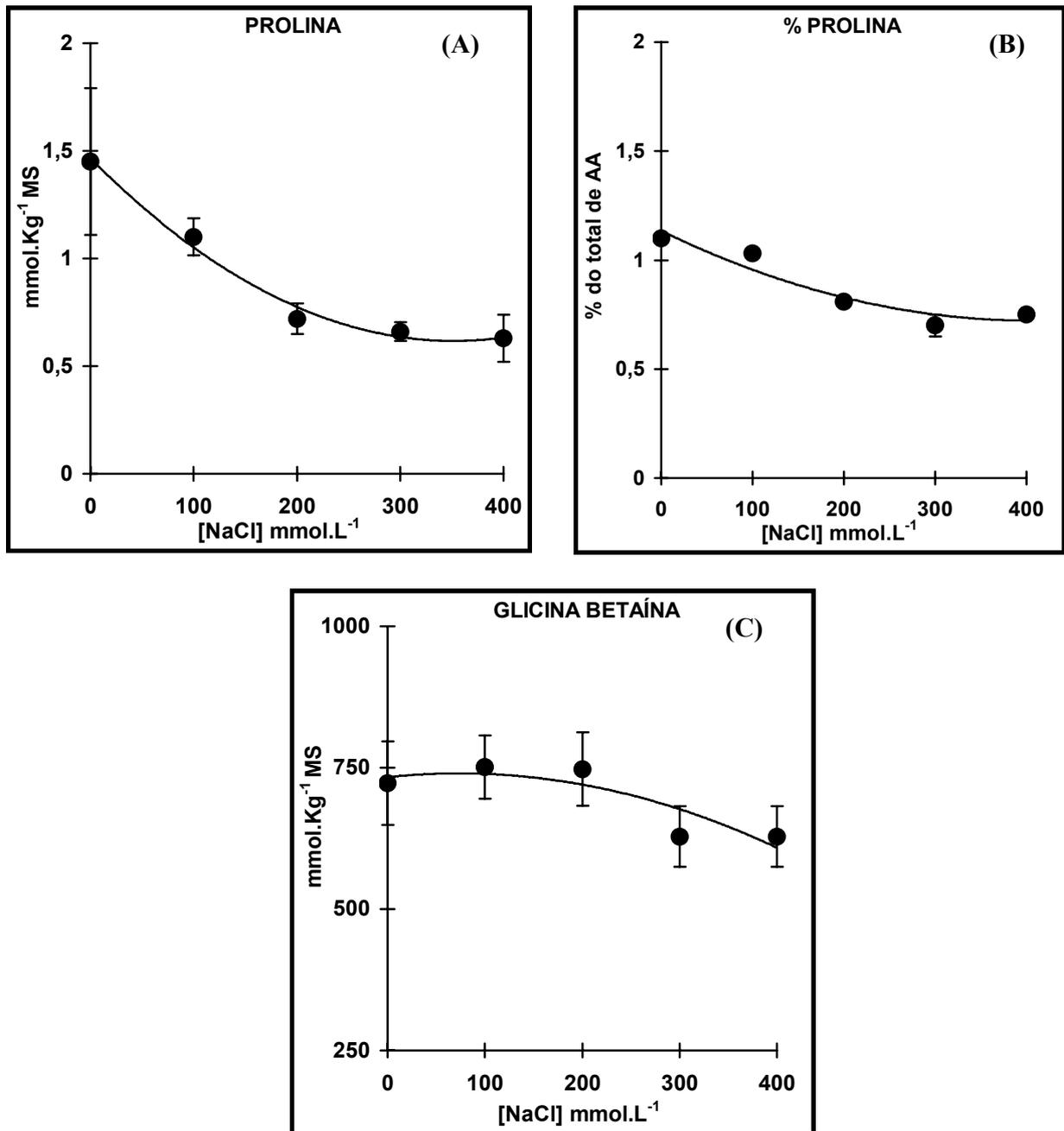
**FIGURA 06** – Variação no conteúdo de cálcio (A) e magnésio (B) total das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.



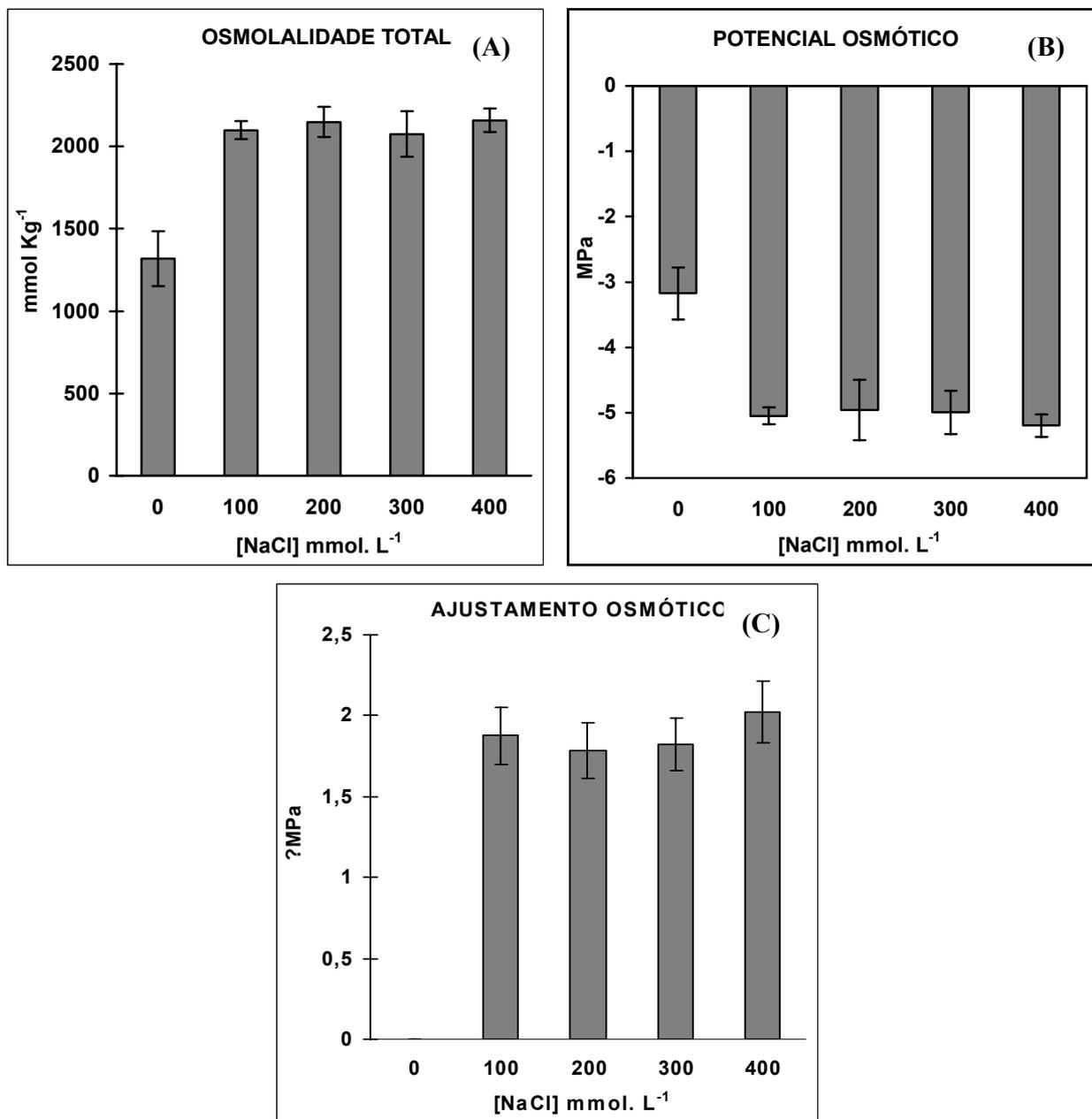
**FIGURA 07** – Variação no conteúdo de nitrato (A), fosfato (B) e sulfato das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.



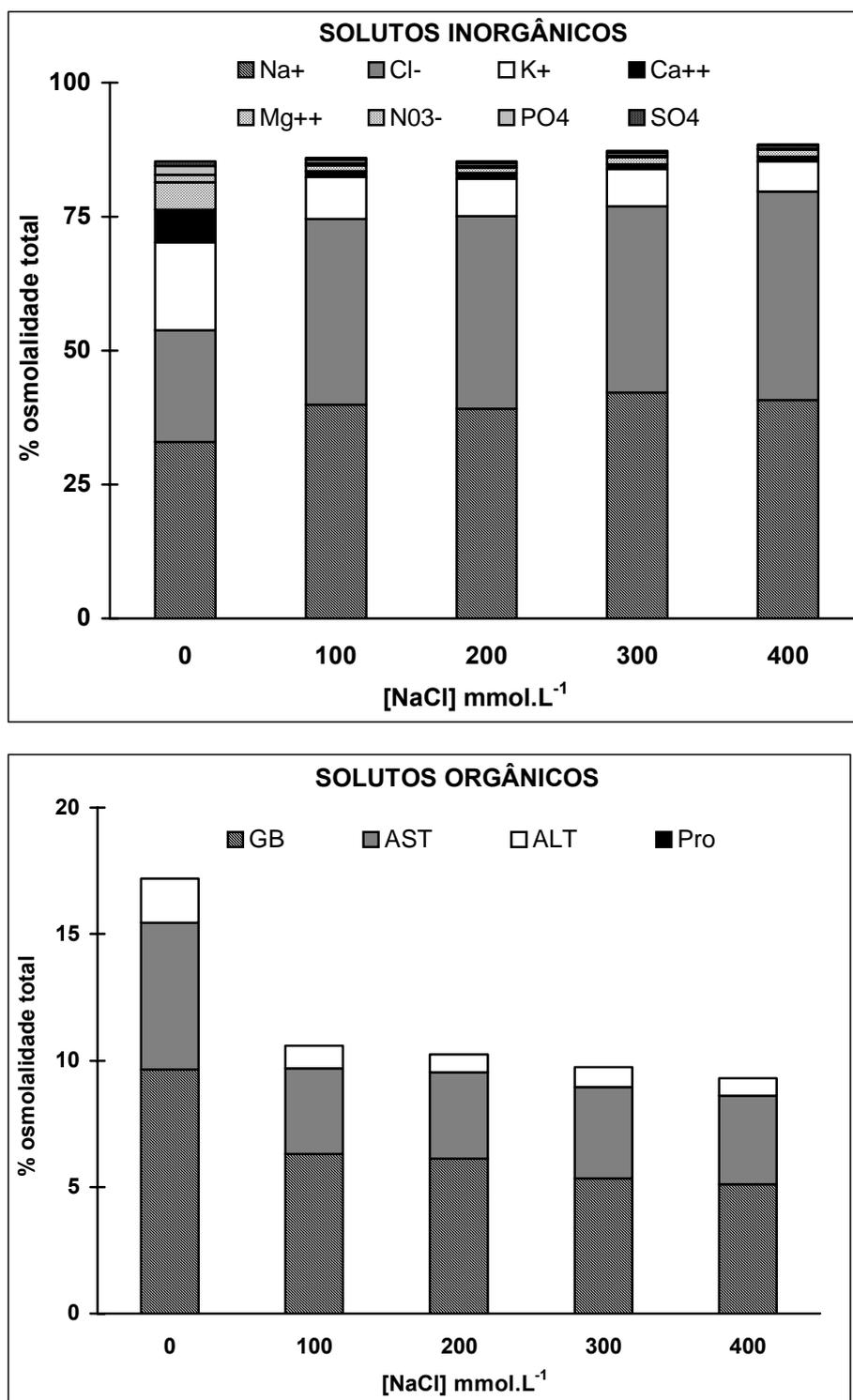
**FIGURA 08** – Variação na concentração de açúcares solúveis (A), proteínas solúveis (B) e aminoácidos livres (C) das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.



**FIGURA 09** – Variação na concentração de prolina (A), percentual de prolina em relação ao pool de aminoácidos livres (B) e concentração de glicina betaína (C) das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.



**FIGURA 10** – Variação na osmolalidade total (A), no potencial osmótico (B) e no ajustamento osmótico (C) das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.



**FIGURA 11** – Contribuição relativa de solutos inorgânicos (A) e solutos orgânicos (B) na osmolalidade total das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.

**Tabela 2** - Contribuição relativa (%) de solutos inorgânicos na osmolalidade total das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.

Tratamentos	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>
[NaCl] mM	%							
0	32,89	20,91	16,39	6,09	5,16	1,44	1,55	0,94
100	39,94	34,58	7,83	1,14	1,09	0,41	0,62	0,32
200	39,18	35,92	6,98	1,11	0,98	0,32	0,54	0,32
300	42,20	34,80	6,94	0,83	1,34	0,34	0,54	0,34
400	40,77	38,88	5,73	0,78	1,30	0,31	0,49	0,27

**Tabela 3** - Contribuição relativa (%) de solutos orgânicos na osmolalidade total das folhas de plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400mM) por um período de 120 dias.

Tratamentos	Glicina betaína	Açucars solúveis	Aminoácidos livres	prolina
[NaCl] mM	%			
0	9,65	5,80	1,73	0,018
100	6,30	3,40	0,88	0,009
200	6,12	3,40	0,72	0,006
300	5,33	3,63	0,78	0,006
400	5,12	3,49	0,68	0,005

### 3.4 DISCUSSÃO

O estresse iônico e osmótico são eventos fisiológicos frequentemente associados com a salinidade provocada pelo excesso de sais, que podem reduzir o crescimento vegetal através de mecanismos que não são bem conhecidos. Mecanismos de adaptação celular como a compartimentalização de íons salinos e o ajustamento osmótico (AO) são vitais para plantas tolerantes ao sal continuar o crescimento na presença de alta salinidade (Volkmar et al., 1998). Embora os mecanismos de tolerância à salinidade ainda não estejam bem conhecidos (Hasegawa et al., 2000), o acúmulo de íons inorgânicos e a síntese e acúmulo de solutos orgânicos compatíveis, tem sido considerados mecanismos ubíquos para o ajustamento osmótico celular de plantas sob condições de estresse salino (Strange, 2004).

Em plantas que acumulam uma grande quantidade de íons salinos dentro da célula, como as halófitas em geral, o vacúolo tem um papel central no ajustamento osmótico em condições de altas concentrações de sais. Em adição, o estresse salino induz a acumulação de solutos orgânicos que são compatíveis com a função das biomoléculas, sendo importantes para a proteção celular e para o ajustamento osmótico, especialmente do citoplasma e organelas (Khan et al., 1998). Com isso, a habilidade das plantas se ajustar osmoticamente ao desbalanço iônico (homeostase iônica), provocado pelo excesso de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas células vegetais é vital para a manutenção do crescimento em condições de elevada salinidade. O presente trabalho fornece pela primeira vez, um compreensivo estudo ao nível de planta inteira quanto à participação e a relativa contribuição da maioria dos osmolitos inorgânicos e orgânicos que são envolvidos com o AO das folhas de uma típica espécie de halófito (*Atriplex nummularia* L.) em resposta a doses crescentes de NaCl.

O gênero *Atriplex* está entre o possuidor de espécies de plantas superiores mais tolerantes ao sal, possuindo uma adaptação à salinidade, por tolerar altas concentrações internas de sais e/ou pela excreção de sais (McKell, 1994; Khan et al., 2000). A resposta fisiológica geral apresentada pelas plantas de *Atriplex nummularia* a presença de diferentes níveis de NaCl, na presente pesquisa, está de acordo com outros trabalhos existentes na literatura com esta espécie de halófito (Ashby & Beadle, 1957; Araújo, 2003; Araújo et al., 2006) e também com outras espécies do gênero *Atriplex* (Gale & Poljakoff-Mayber, 1970; Flowers et al., 1977; Glenn et al., 1998; Khan et al., 2000; Maggio et al., 2000).

Inicialmente, em termos de produção de massa seca, está amplamente relatado na literatura que as halófitas em geral (Flowers et al., 1977), *A. nummularia* e outras espécies de *Atriplex* tem seu crescimento favorecido pela presença de sais em excesso no solo (Chatterton & Mckell, 1969; Glenn et al., 1998; Khan et al., 2000; Ramos et al., 2004). No presente trabalho, a presença de NaCl na água de irrigação favoreceu uma maior produção de massa seca nas folhas (Figura 3A), sendo que houve uma tendência de igualdade entre as doses de NaCl adotadas neste trabalho, provavelmente devido ao efeito do NaCl ao longo período de exposição (120 dias) na fisiologia das plantas, onde provavelmente as plantas tratadas com sal se ajustaram e/ou adaptaram-se as condições de salinidade.

Deve ser ressaltado que os teores de cinzas e MOS (livre de cinzas), tiveram o mesmo comportamento como constatado por Khan et al., (2000), mostrando que os teores de cinzas aumentaram com a aplicação do NaCl, mas não de forma significativa entre as doses testadas. Destaca-se que o incremento de matéria seca orgânica (MOS) nas folhas das plantas tratadas com 200 mM de NaCl (Figura 3C), em relação ao controle, foi de 2,29 g planta<sup>-1</sup> o que correspondeu a um aumento 40% aproximadamente, valor esse descontado as cinzas, concluindo assim que provavelmente o NaCl teve um efeito benéfico na taxa de fotossíntese líquida. Como esperado, o modelo de resposta quanto aos parâmetros de crescimento teve uma tendência parabólica, nas folhas, e estes resultados conferem com os achados por (Araújo, 2003; Khan et al., 2000; Glenn et al., 1999; Qiu & Lu, 2003).

O status hídrico das plantas de *Atriplex nummularia*, analisado através da umidade, conteúdo relativo de água (CRA) e suculência das folhas, foi aumentado significativamente com a adição do NaCl (Figura 4). A alta suculência foliar e um alto conteúdo relativo de água é uma estratégia adaptativa que contribui para a regulação da concentração iônica interna em muitas halófitas diante de condições ambientais adversas (Short & Colmer, 1999). Neste estudo a irrigação de *A. nummularia* com NaCl foi capaz de aumentar cerca de 15% o CRA das folhas. Em adição, a suculência das folhas das plantas tratadas com NaCl, foi mantida em valores maiores que o das plantas crescidas na ausência de sal. Esses resultados indicam para um bom status hídrico na presença de NaCl e sugere fortemente que o AO foi efetivo nas folhas de *A. nummularia*, como descrito por Martínez et al., 2003 & Martínez et al., 2004 que trabalharam com *Atriplex halimus* sob condições de déficit hídrico.

Nesse presente estudo ambos o CRA e a suculência foram positivamente relacionados com o AO. Em adição, o AO calculado foi consideravelmente maior nas folhas das plantas tratadas com o NaCl (Figura 10C) e isto propõe ser o maior processo fisiológico que favorece a manutenção do crescimento de *A. nummularia* sob condições de alta salinidade. O papel da suculência para o balanço do sal absorvido em espécies de halófitas não-secretoras já tem sido amplamente descrito (Popp, 1995), existindo uma correlação positiva entre o aumento da concentração de sódio no tecido e a suculência das folhas (Waisel, 1972; Murakeozy *et al.*, 2003). Esse aumento da suculência foliar tem como objetivo balancear a toxicidade iônica interna criada em condições de salinidade aumentando o conteúdo hídrico total da planta, principalmente das folhas, graças às vesículas armazenadoras de sal.

No presente estudo, as concentrações reais de NaCl na solução do solo nas proximidades das raízes, para cada nível de NaCl aplicado, foram crescentes ao longo do tempo. O trabalho conduzido por Ashby & Beadle, (1957) com *A. nummularia* mostrou que essa espécie apresentou crescimento máximo com 200 mM de NaCl, tendo sobrevivido com 400 mM e morrendo com 600 mM em condições de solução nutritiva. Em trabalho realizado por Araújo, (2003) com substrato arenoso também verificou esta mesma tendência observada por Ashby & Beadle, (1957), porém neste tipo de substrato (areia) as plantas de *A. nummularia* apenas diminuíram sua taxa de crescimento, entre 300 e 600 mM, contudo não apresentaram injurias e/ou sintomas oriundos do estresse salino, e tampouco morreram.

Conforme pôde ser observado em relação aos teores de íons inorgânicos nas folhas durante o período de aplicação dos tratamentos salinos (120 dias) houve uma tendência de estabilização (platô) entre as doses crescentes de NaCl testadas, sendo somente estes diferentes das plantas que cresceram na ausência total de sal. Já é conhecido que a maioria das espécies vegetais, principalmente as de valor agrônômico como a maioria das glicófitas, o  $\text{Na}^+$  não é um nutriente exigido em níveis elevados. Entretanto, certas halófitas como a *A. nummularia*, crescem melhor com um grande suprimento de NaCl, tendo um crescimento ótimo em torno de 100-200 mM (Greenway, 1968). Em algumas espécies de halófitas, como a *Halogeton glomeratus*, uma erva daninha, essa espécie tem uma necessidade tão elevada de sal que o  $\text{Na}^+$  pode ser considerado um macronutriente (Williams, 1960). Enquanto o  $\text{Cl}^-$  é essencial para regulação de água no sitio de oxidação da água no fotossistema II (Bowyer e Leegood, 1997), não obstante o

$\text{Cl}^-$  é importante para plantas da família *palmae*, como o coco (*Cocos nucifera* L.) devido seu poder com agente osmótico.

As halófitas acumulam altas concentrações de íons inorgânicos dentro das células, com o intuito de baixar o potencial hídrico e garantir assim a absorção de água para poder crescer em solos com problemas de excesso de sais (Glenn & Brown, 1999). Como era de se esperar, a adição de NaCl causou um aumento nas concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e um decréscimo generalizado nas concentrações de todos os outros solutos inorgânicos analisados nas folhas (Figura 5C, 6, 7). Diversos trabalhos na literatura demonstram que a salinidade promove um aumento nos teores de sódio e cloreto, tanto em glicófitas (Greenway & Munns, 1980) como em halófitas (Flowers et al., 1977). Contudo, essa acumulação de íons salinos pode causar problemas de toxicidade iônica, deficiências nutricionais ou ambos (Greenway & Munns, 1980; Munns & Termat, 1986). Pois o aumento nas concentrações de  $\text{Na}^+$  com concomitante redução nas concentrações de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , aumenta excessivamente as relações  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$  no tecido vegetal em condições de estresse salino, provocando um desbalanço nutricional na planta (Rogers & Noble, 1992; Ullah et al., 1993).

O aumento do conteúdo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , acompanhado pelo decréscimo das concentrações de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $\text{SO}_4^{-2}$  observado nas folhas das plantas tratadas com NaCl neste trabalho, evidenciam que essas espécies de halófitas substituí plenamente as possíveis carências ocasionadas pela falta destes macronutriente com o aumento da concentração de íons salinos. Ao que tudo indica esta espécie possui uma dependência química muito forte pelo  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , explicada pelo fato destas serem originárias de áreas desérticas, pobres em  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $\text{NO}_3^-$ , e ricas em  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Como forma de sobrevivência a este ambiente infértil e hostil, estas espécies vegetais desenvolveram ao longo da evolução um mecanismo que aproveitasse esses íons salinos em maior abundância, que seriam as vesículas armazenadoras de sais permitindo assim a absorção de água e sais que seriam usados em seu metabolismo nutricional. Dessa maneira, é provável que essas espécies halófitas incluídas de sais possuam uma programação genética para acumular intensamente íons em seus tecidos especialmente nas folhas independente das concentrações externas.

Em de *Atriplex halimus* as concentrações de cátions ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ) e ânions inorgânicos ( $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $\text{NO}_3^-$ ) foram também diminuídas na presença de NaCl (Bajji et al., 1998). Tem sido sugerido que o tratamento com NaCl provoca o decréscimo significativo da

concentração de  $\text{NO}_3^-$  das folhas de não halófitas (Gouia et al., 1994; Botella et al., 1997) e isto pode ser devido ao antagonismo entre  $\text{NO}_3^-$  e o  $\text{Cl}^-$  (Bottacin et al., 1985) ou a interferência do NaCl externo com um ou mais tipos de transportadores na membrana plasmática de células da raiz (Stientra, 1986).

A redução do conteúdo de  $\text{K}^+$  nas folhas de *Atriplex nummularia* foi à extensão de 1.227,60 para 703,31  $\text{mmol kg}^{-1}$ . Em outro estudo recente com esta espécie de *Atriplex*, as concentrações de  $\text{K}^+$  nas folhas também foram bastante reduzidas (Araújo, 2003). Ressalte-se, se for assumido que 90% do volume de folhas de *Atriplex* são constituídos por vacúolos (Flowers et al., 1977) e que a maior parte do  $\text{K}^+$  está localizado no citoplasma e organelas, então sua concentração no citoplasma deve ser ainda mais elevada, mostrando assim que o  $\text{K}^+$  deve desempenhar um papel fundamental no ajustamento osmótico do citoplasma. Entretanto, faz-se necessário ressaltar que em doses elevadas (500 mM de KCl) o  $\text{K}^+$  mostrou efeitos mais deletérios que o próprio  $\text{Na}^+$  (500 mM de NaCl), como foi mostrado por Ramos et al., (2004) trabalhando com *A. nummularia* utilizando doses crescentes de NaCl e KCl, o que vem reforçar a teoria que estas plantas possuem uma grande avidez por sais, principalmente ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ), avidez essa explicada em parte pela sua origem, visto que essas são originárias de desertos salinizados da Austrália.

A redução na concentração de  $\text{K}^+$  nos tecidos de halófitas cultivadas com excesso de sais é bastante citada na literatura (Mozafar et al., 1970; Flowers et al., 1977; Khan et al., 2000; Araújo, 2003). É provável que a redução seja causada pela diminuição na absorção (influxo) ou devido a aumento no efluxo de  $\text{K}^+$  causado pelo aumento no influxo de  $\text{Na}^+$  em condições de salinidade provocada por NaCl. Na realidade, ainda não existem na literatura estudos sobre cinética de influxo/efluxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  em halófitas os quais poderiam esclarecer as reais interações entre esses dois íons. A hipótese mais aceita é que as plantas cultivadas na ausência ou presença de baixos níveis de NaCl compensem essa carência aumentando a absorção de outros íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$  (Figura 5C, 6, 7). Trabalhos recentes com *Atriplex griffithii* (Khan et al., 2000) confirmam essa hipótese. Neste trabalho, os níveis de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  foram intensamente maiores nas folhas das plantas não tratadas com NaCl.

Uma das respostas metabólicas ao estresse salino é a síntese e/ou acumulação de solutos orgânicos compatíveis. Esses compostos osmoticamente ativos são açúcares poliois, aminoácidos e compostos quartenários de amônio (Rhodes & Hason, 1993). Além de seu papel

estritamente osmótico, a acumulação de solutos orgânicos pode auxiliar na estabilização das proteínas, complexos protéicos e membranas, bem como na manutenção das homeostase iônica e osmótica ou servirem como reserva de carbono e nitrogênio em condições adversas (Bohnert & Shen, 1999; Bray et al., 2000). Já é bem conhecido na literatura que xero-halófitas arbustivas do mediterrâneo, como algumas espécies de *Atriplex*, ocorre à acumulação de prolina, compostos quaternários de amônio, açúcares solúveis em suas células quando expostas a salinidade, tanto ao nível de tecido como de planta inteira (Bajji et al., 1998).

A acumulação de açúcares solúveis em plantas em resposta ao estresse hídrico é bem documentada e tendo sido considerado ter um importante papel no ajustamento osmótico (Kameli & Losel, 1995; Hare et al., 1998; Bajji et al., 2001). Entretanto neste trabalho, o conteúdo de açúcares solúveis nas folhas permaneceu inalterado com a imposição do tratamento salino (Figura 8A). No presente estudo, as plantas tratadas com NaCl mostraram uma diminuição dos teores de proteínas solúveis, aminoácidos livres e prolina (Figura 8B, 8C, 9A). O decréscimo significativo do conteúdo de prolina das folhas com o NaCl já foi observado por Araújo (2003), mostrando que a prolina não foi acumulada em tecidos de *A. nummularia* em quantidades suficientes para funcionar como um osmolito e sim apenas como protetor de biomoléculas ou fonte de carbono e nitrogênio. Por outro lado, em condições de estresse salino, Bajji et al. (1998) observou um aumento nos níveis de prolina nas folhas de *Atriplex halimus*. Essa diminuição nas concentrações de proteínas solúveis, aminoácidos livres e prolina observadas nas plantas tratadas com NaCl, podem refletir a utilização desses compostos nitrogenados como fonte de energia e esqueletos de carbono e nitrogênio para biossíntese de massa seca, principalmente em 200 mM de NaCl (Figura 3A).

Em muitas espécies de plantas, a acumulação de prolina e glicina betaína pode ocorrer concomitante (Girija et al., 2002), porém permanece desconhecido como a acumulação de glicina betaína pode reduzir a extensão da acumulação de prolina (Gibon et al., 1997). Uma correlação positiva entre a concentração de sal e a acumulação de glicina betaína foi registrada em várias halófitas como em *Atriplex semibaccata* e *Atriplex halimus* (Koheil et al., 1992), *Spartina alterniflora* (Cavalieri, 1983), Suaeda monóica (Storey & Win Jones, 1979), *Atriplex griffithii*, *Suaeda fruticosa*, *Haloxylon recurvum*, *Halopyrum mucronatum* (Khan et al., 1998). Ao contrário, neste trabalho não houve aumento significativo no conteúdo de GB das folhas com o

tratamento salino, sendo esse conteúdo até decrescido nas doses mais elevadas de NaCl (300 mM e 400 mM ) como pode ser evidenciado na Figura 9C.

Apesar dos níveis de GB, neste estudo não terem sofrido aumento significativo com a aplicação do estresse salino, sua concentração em base de água no tecido (% da osmolalidade total), foi muito mais elevada que os outros solutos orgânicos analisados (Figura 11 e Tabela 3), sendo isso acompanhado por um decréscimo significativo do *pool* de aminoácidos livres nas folhas (Figura 8C). Nós podemos argumentar então que o aumento da síntese de GB em condições de alta salinidade pode está em parte suportada por precursores de aminoácidos do pool solúvel. Como a GB está confinada no citossol das células vegetais que compreende cerca de 10% do volume total da célula (Flowers *et al.*, 1977), a contribuição de GB para o AO do citossol pode ser 10 vezes maior. Neste caso, GB pode contribuir com a maioria do AO do citoplasma das células das folhas. Apesar de ser considerada um eficiente osmolito, GB também está envolvida com a tolerância à desidratação (Sakamoto *et al.*, 1998), na estabilização de proteínas estruturais do complexo fotossintético (FSII) (Papageorgiou & Murata, 1995) e para prevenir os danos ocasionados nas membranas celulares de plantas estressadas pelo sal (Yang *et al.*, 1996).

Apesar das inúmeras pesquisas demonstrarem a importância da acumulação de solutos orgânicos e inorgânicos para o ajustamento osmótico de espécies de halófitas sob condições de extrema salinidade (Glenn & Brown, 1999; Ramos *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2005), poucos estudo existem na literatura sobre a contribuição relativa desses solutos no potencial osmótico e na osmolalidade total do tecido de plantas pertencentes ao gênero *Atriplex* sob estresse salino. As plantas de *Atriplex nummularia* tratadas com NaCl neste estudo mostraram mudanças significativas na osmolalidade total e no potencial osmótico das folhas quando comparado com as plantas que cresciam na ausência do sal. O NaCl provocou um aumento significativo na osmolalidade total acompanhado pelo decréscimo do potencial osmótico das folhas. As halófitas *Salicornia europaea* e *Suaeda marítima*, o potencial osmótico decresceu de -1,5MPa até cerca de -6,0MPa em 510mM de NaCl, evidenciando assim o ajustamento osmótico dessas espécies vegetais (Moghaieb *et al.*, 2004). Em nosso estudo, o tratamento salino provocou uma diminuição do potencial osmótico de -3,1MPa até cerca de -5,1MPa em 400mM de NaCl (Figura 10C). Já foi demonstrado na literatura, que a acumulação de solutos orgânicos e inorgânicos nas

células, contribui para o abaixamento do potencial osmótico da planta, favorecendo assim a entrada e a manutenção de água nas células (Niu *et al.*, 1995).

Dos solutos inorgânicos analisados neste trabalho o maior percentual de contribuição para essas mudanças observadas na osmolalidade total e no potencial osmótico foram os íons salinos  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , sendo aproximadamente 40% e 38%, respectivamente, na maior dose de NaCl (400mM) (Tabela 2). Já foi verificado que os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  podem contribuir enormemente para o ajustamento osmótico de células de folhas de plantas de *Atriplex nummularia* (Flowers *et al.*, 1977; Glenn & Brown, 1999; Ramos *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2006). Nos últimos anos, uma considerável atenção tem sido dada sobre o envolvimento do  $\text{Na}^+$  no ajustamento osmótico de espécies de halófitas. A implicação do  $\text{Na}^+$  no processo de ajustamento osmótico pode ser considerada, assumindo que este é principalmente presente nos vacúolos e que estes compartimentos ocupam mais ou menos 90% do volume total da célula. (Martinez *et al.*, 2005). O tratamento salino provocou a diminuição da contribuição relativa (% da osmolalidade total) de todos os outros solutos inorgânicos analisados, demonstrando assim o nosso estudo, que para essa espécie de halófitas, o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  são muito importantes para osmorregulação das células em condições de estresse salino provocado pelo NaCl.

Neste estudo a contribuição relativa de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  para o potencial osmótico das folhas, foram muito baixas, menos de 1% da osmolalidade total das folhas (Tabela 2), isso corroborou com outro estudo, onde a estimativa de contribuição de  $\text{NO}_3^-$  para o potencial osmótico foi muito baixa em algumas espécies de halófitas submetidas ao tratamento com doses elevadas de NaCl ( Song *et al.*, 2006). Da mesma forma, o NaCl provocou também um decréscimo significativo no percentual de contribuição relativa dos solutos orgânicos para o potencial osmótico das folhas (Tabela 3). Neste estudo, a contribuição de prolina foi baixíssima, demonstrando assim que a quantidade não foi suficiente para promover o AO das folhas tratadas com o NaCl. Como já visto em outro estudo, Prolina não teve um papel importante na osmorregulação de algumas espécies de halófitas sob estresse salino (Song *et al.*, 2006).

### 3.5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados da presente investigação demonstram que as plantas de *Atriplex nummularia* foram capazes de manter o seu crescimento mesmo em condições de alta salinidade, principalmente pela capacidade de manutenção de seu status hídrico. Os resultados também sugerem que a GB é o maior soluto orgânico envolvido com o AO do citoplasma das células de folhas de plantas de *Atriplex nummularia* sob estresse salino e esta acumulação parece ser uma resposta adaptativa ao estresse provocado pelo NaCl. Em adição, o íons salinos Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> contribuem para a maioria do AO das folhas nessas condições de alta salinidade. O impacto relativo do K<sup>+</sup> sobre o AO das folhas foi reduzido consideravelmente com o aumento da dose externa de NaCl.

## **4. CAPÍTULO 2- “Efeitos do Pré-Condicionamento com NaCl no Potencial Osmótico de Plantas de *Atriplex nummularia* Expostas a Sucessivos Ciclos de Seca/Re-hidratação”**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

A seca é provavelmente um dos mais importantes fatores que limita a produtividade agrícola nas grandes regiões do mundo (Jones & Corlett, 1992), principalmente nas regiões semi-áridas. A seca é definida como um prolongado período sem água. Para um período de seca afetar uma comunidade de planta, o déficit de chuva deve levar a um déficit hídrico do solo e por último, a um déficit hídrico da planta (Levitt, 1980). É o grau no qual a planta pode suportar a falta de chuva que caracteriza sua resistência à seca (Paleg & Aspinall, 1981; Hanson & Hitz, 1982; Schulze, 1986).

A seca afeta negativamente a performance das plantas, por decrescer o potencial hídrico do meio externo, resultando em redução do crescimento (Erdei & Taleisnik, 1993). A redução do teor de água no protoplasma afeta as suas propriedades estruturais, elásticas e de coesão, pois a água é o seu principal constituinte, solvente, reagente, mantenedor da turgescência e regulador térmico das células vegetais (Angelloci, 1995). O processo de crescimento celular, através da síntese de proteínas e de parede celular, é o mais sensível às reduções na disponibilidade de água nos tecidos (Salisbury & Rossi, 1991; Nobel, 1992). A falta de água também pode afetar a eficiência dos processos fotossintéticos (Keles & Oncell, 2002).

O estresse hídrico é um expressivo problema para a produção vegetal, pois existe um efeito inibitório na acumulação de biomassa (Nonami *et al.*, 1997; Mullet & Whitsitt, 1996). Decrescendo o potencial de água de semente – 0,1 Mpa (às vezes menos) resulta o decréscimo perceptível no crescimento celular (irreversível alongamento celular) e assim redução no crescimento da raiz e da parte aérea (Sakurai & Kuraishi, 1988). A inibição da expansão celular é

comumente seguida por uma redução na síntese de parede celular (Salisbury & Ross, 1992). Síntese de proteína pode ser quase igualmente sensível ao estresse hídrico (Nobel, 1992).

Em condições de deficiência hídrica, a habilidade das plantas em manter o status hídrico das células (ajustamento osmótico) e a integridade celular pode ser uma vantagem adaptativa. Mudanças nas propriedades de elasticidade do tecido e na concentração de solutos podem promover a manutenção do turgor e volume celular apesar do baixo potencial hídrico (Ayoub *et al.*, 1992). Sob condições de seca, a manutenção do turgor das células pode ocorrer através do ajustamento osmótico, por uma acumulação líquida de solutos a fim de obter um gradiente favorável de potencial hídrico. O ajustamento osmótico, entretanto, tem uns custos energéticos alto, que pode afetar negativamente a produtividade da planta e o uso eficiente da água (Turner & Jones 1980).

Apesar dos anos de pesquisas sobre o estudo do déficit hídrico em plantas superiores, os processos moleculares que são mais rapidamente afetados, como também os mecanismos iniciais da resposta molecular, ainda não estão bem compreendidos (Bray, 1993). Sabe-se atualmente, que as inúmeras espécies vegetais apresentam enorme diversidade de mecanismos fisiológicos para adaptação à seca, apesar desses mecanismos ainda não serem completamente compreendidos (Ingram & Bartels, 1996). Ao contrário do era veiculado anteriormente, as vias de sinalização não são isoladas uma das outras, participando de uma maior e complexa rede de vias, com diversas sobreposições entre as cadeias. Esse fato permite especular, que muitos genes podem ser induzidos por mais de um estímulo em particular (Knight & Knight, 2001).

A manutenção do turgor durante mudanças no status hídrico da planta pode preservar processos metabólicos da planta e contribuir para o crescimento em condições de escassez de água. O ajustamento osmótico é um mecanismo usado para a manutenção do turgor e redução dos efeitos deletérios do estresse hídrico sobre tecidos vegetais (Flowers *et al.*, 1991). A manutenção

de um alto conteúdo relativo de água em condições de déficit hídrico é usualmente bem correlacionada com a produção de biomassa (Teulat *et al.*, 1997). Muitas halófitas regulam o turgor pela acumulação de NaCl, para alcançar concentrações mais elevadas do que aquela no meio salino (Jacoby, 1994).

Em espécie pertencente ao Gênero *Atriplex* ambos, o K<sup>+</sup> e o Na<sup>+</sup> estão envolvidos no ajustamento osmótico de tecidos foliares submetidos a um baixo potencial hídrico externo que pode ser causado, por baixa umidade do solo ou problemas de excesso de sais no solo (Osmond *et al.*, 1980). Em geral, o K<sup>+</sup> é acumulado em resposta à baixa umidade do solo, enquanto o Na<sup>+</sup> é acumulado sob condições salinas (Glen *et al.*, 1996). Estudos têm evidenciado o papel do Na<sup>+</sup> na osmorregulação em plantas sob condições de estresse salino, enquanto os solutos orgânicos são importantes em condições de déficit hídrico (Song *et al.*, 2006).

As espécies vegetais variam em sua susceptibilidade e na resposta ao decréscimo do potencial hídrico ocasionado pela seca, embora todas tenham a capacidade intrínseca de percepção, sinalização e resposta aos efeitos do estresses abióticos, como seca e salinidade, de modo isolado ou combinado (Bohnert *et al.*, 1995). Para sobreviver, as plantas utilizam vias e componentes comuns durante a resposta a vários tipos de estresses diferentes (Pastori & Foyer, 2002). Este fenômeno, conhecido por tolerância cruzada, permite à planta se adaptar/aclimatar a uma gama de estresses, após a exposição a um único estresse específico (Pastori & Foyer, 2002).

As vias que conduzem os estímulos da seca e do estresse salino são interconectadas pelos estresses primários e pelas respostas conferidas (homeostase, desintoxicação e controle do crescimento). O ajustamento osmótico (AO) é definido como a diminuição do potencial hídrico da planta devido à acumulação líquida de solutos em resposta ao estresse hídrico, pode servir como um mecanismo de tolerância á seca em várias espécies vegetais (Blum, 1989; Zhang *et al.*, 1999; Chimenti *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003).

Investigando a ocorrência simultânea do estresse hídrico e salino em *Atriplex canescens*, Glenn & Brown (1998) concluíram que os efeitos de ambos os estresses, não são estritamente aditivos na redução da performance da planta e que a tolerância a ambos os estresses está ligada a um mecanismo comum de absorção de  $\text{Na}^+$  para o ajustamento osmótico. O pré-condicionamento de plantas a determinados fatores de estresses constitui assim uma excelente ferramenta para a obtenção da tolerância a outros estresses abióticos como a seca e a salinidade em plantas (Maia, 2004). Apesar da importância da tolerância cruzada na aclimação de plantas a inúmeros fatores de estresses, poucos estudos ainda são realizados como o intuito de verificar esses mecanismos.

Este trabalho teve o intuito de investigar se o pré-condicionamento de plantas de *Atriplex nummularia* ao NaCl, influenciaria na resposta do potencial osmótico dessas plantas após a exposição a ciclos sucessivos de seca/re-hidratação.

## **4.2 - MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **4.2.1 - Material vegetal**

Em toda fase experimental, foram utilizadas mudas de erva-sal (*Atriplex nummularia* Lindl.) que foram propagadas vegetativamente por estaquia, obtidas a partir de matrizes oriundas do campo. Na época do experimento as mudas tinham dezoito meses de idade, sendo cultivadas em baldes de polietileno com capacidade para 5 L, contendo como substrato vermiculita expandida com granulação do tipo médio, possuindo uma capacidade médias de retenção de água na proporção de 1,7 ( 70% a base de volume).

### **4.2.2 - Local e condições do experimento**

O experimento foi desenvolvido em condições de casa de vegetação, do Laboratório de Nutrição de Plantas e Estresse Ambiental – (LABPLANT) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza-CE cuja localização é de latitude 3° 44' sul e longitude 38° 33' W e clima local do tipo AW na classificação de Koeppen. O período experimental foi compreendido entre os meses de Agosto e outubro de 2005. Durante o experimento as condições ambientais da época, no interior da casa de vegetação, foram: fotoperíodo de 12 horas de luz, temperaturas mínima 24°C, máxima 36°C, temperaturas médias diárias de 28°C, umidade relativa do ar mínima de 45%, máxima de 85%, médias diárias de 65% e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **4.2.3 Solução nutritiva**

Durante o experimento, foi utilizada a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada conforme a composição descrita na tabela 01 da pág.72

### **4.2.4 - Condução e tratamento das plantas**

As mudas de *Atriplex nummularia*, com idade de 18 meses foram transplantadas para recipientes de polietileno contendo 5,0 kg de vermiculita (uma planta/ recipiente). Todos os recipientes contendo as plantas foram lavados exaustivamente com água destilada visando lixiviar o excesso de sais do substrato. Plantas uniformes em tamanho foram separadas em dois grupos, onde foram submetidas aos seguintes pré-condicionamentos por 30 dias: (1) grupo de plantas irrigadas somente com solução nutritiva de Hoagland e (2) grupo de plantas irrigadas com

solução nutritiva de Hoagland acrescida de 200 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl. A irrigação nesta fase era efetuada a cada três dias. Semanalmente era coletado o lixiviado dos recipientes, a fim de monitorar a condutividade elétrica e o pH das soluções dos mesmos.

Após trinta dias de pré-condicionamento, foram aplicados aos dois grupos de plantas três ciclos sucessivos de seca/re-hidratação, onde cada ciclo correspondia a uma semana de tratamento. Foram separados quatro subgrupos de plantas, onde foi adotado o seguinte tratamento: (a) plantas pré-condicionadas com solução nutritiva sem a suspensão da rega (**controle**); (b) plantas pré-condicionadas com solução nutritiva com suspensão da rega (seca) ; (c) plantas pré-condicionadas com NaCl com suspensão da rega (NaCl + seca) e (d) plantas pré-condicionadas com NaCl sem a suspensão da rega (NaCl). E este procedimento foi realizado durante três semanas (ciclos), onde no final de cada ciclo, os recipientes eram saturados com as respectivas soluções, correspondendo assim a três ciclos de seca/re-hidratação. Sendo que na última semana, todas as plantas foram irrigadas com água destilada, até a saturação do substrato, a fim de promover uma recuperação dos respectivos tratamentos adotados.

#### **4.2.5 – Colheita das plantas e determinação analíticas**

Após cada semana (ciclo) de tratamento e também após 48h de recuperação foram feitas medidas do conteúdo relativo de água, umidade, suculência, vazamento de eletrólitos, osmolalidade total, potencial osmótico e ajustamento osmótico das folhas. As demais determinações analíticas, incluindo solutos inorgânicos e orgânicos foram feitas somente na última coleta (após 48h de recuperação). As plantas foram regularmente fotografadas com o objetivo de registrar os sintomas visuais do estresse e/ou quaisquer outras modificações morfológicas na parte aérea das plantas. Na colheita final, foi feita pesagem da massa fresca das folhas, e onde posteriormente foram transferidas para secagem em estufa com circulação de ar quente a 70 °C durante 48 horas, sendo pesados novamente para determinação da massa seca.

##### **4.2.5.1 – Conteúdo relativo de água (CRA), Umidade e Suculência foliar**

Foram determinados como descrito no item 3.2.6.1 da pág. 73

#### **4.2.5.2 - Integridade das membranas (vazamento de eletrólitos)**

Foi determinado como descrito no item 3.2.6.2 da pág.73

#### **4.2.5.3 – Determinação do teor de cinzas**

Foi determinado como descrito no item 3.2.6.3 da pág.74

#### **4.2.5.4 – Determinação da concentração de sódio e potássio**

Foram determinadas como descrito no item 3.2.6.4 da pág.74

#### **4.2.5.5 – Determinação da concentração de cloreto**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.5 da pág. 74

#### **4.2.5.6 – Determinação da concentração de cálcio e magnésio**

Foram determinadas como descrito no item 3.2.6.6. da pág.75

#### **4.2.5.7 – Determinação do teor de nitrato**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.7 da pág. 75

#### **4.2.5.8 – Determinação da concentração de fosfato e sulfato**

Foram determinadas como descrito no item 3.2.6.8 da pág.75

#### **4.2.5.9 – Determinação da concentração de açúcares solúveis totais**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.9 da pág. 76

#### **4.2.5.10 - Determinação de aminoácidos livres totais (N- $\alpha$ -amino livre)**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.10 da pág.77

#### **4.2.5.11 - Concentração de proteínas solúveis**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.11 da pág. 77

#### **4.2.5.12 - Determinação do teor de prolina livre**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.12 da pág. 78

#### **4.2.5.13 – Determinação de glicina betaína**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.13 da pág. 78

#### **4.2.5.14 - Osmolalidade total, Potencial osmótico e Ajustamento osmótico**

Foram determinados como descrito no item 3.2.6.14 da pág. 79

#### **4.2.5.15 - Contribuição relativa de solutos inorgânicos e orgânicos para o potencial osmótico das folhas**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.15 da pág. 79

#### **4.2.6 - Delineamento experimental e análises dos resultados**

Os tratamentos foram distribuídos de acordo com um delineamento inteiramente casualizado, obedecendo a um esquema (4 x 4), correspondendo respectivamente a quatro tratamentos ( Controle; Seca; NaCl + SECA; NaCl). e quatro repetições, sendo cada parcela experimental representada por um recipiente contendo uma planta, perfazendo um total de 16 parcelas experimentais. Os resultados foram analisados estatisticamente com base na análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey,  $p < 0,05$ ).

### 4.3 RESULTADOS

As plantas de *Atriplex nummularia* quando da realização desse experimento tinham exatamente 18 meses de idade, onde passaram por um período de aclimação em recipientes de polietileno com capacidade de 5L, com solução nutritiva de Hoagland acrescida ou não de 200mM de NaCl por 30 dias. Em seguida, as plantas pré-condicionadas foram submetidas aos ciclos de seca e/ou re-hidratação por um período de um mês, perfazendo assim ao final do experimento, 20 meses de idade (Figura 12).

A massa seca das folhas foi superior no tratamento (NaCl) em torno de 15% quando comparado com o tratamento (CONTROLE). Ressalte-se que não houve diferença significativa na massa seca das folhas das plantas controle com as plantas pré-tratadas com NaCl e expostas à seca (NaCl + SECA). Entretanto as plantas que não foram pré-tratadas com NaCl e submetidas à seca (SECA) apresentaram significativamente a menor massa fresca nas folhas (Figura 14A).

Essa tendência observada para massa seca das folhas foi à mesma encontrada na massa orgânica seca (MOS) das folhas (Figura 14B). Os teores de cinzas observados nas folhas das plantas de *Atriplex nummularia*, diferiram estatisticamente entre o grupo de plantas que foram pré-tratadas com NaCl e foram submetidas ou não à seca (NaCl e NaCl + SECA) e o grupo de plantas que não foram pré-tratadas com NaCl e foram submetidas ou não à seca (CONTROLE e SECA) (Figura 14C).

Em relação à umidade foliar das plantas de *A. nummularia*, somente no tratamento (seca) foi verificada uma redução significativa durante os três ciclos de seca/re-hidratação, comparando com os demais tratamentos (Figura 15A). Após 48h de recuperação todos os tratamentos se igualaram (Figura 15A).

Quanto à medida do conteúdo relativo de água (CRA) das folhas mostrado na Figura 15B, nota-se que durante as três semanas de tratamento não houve diferença significativa entre os tratamentos (CONTROLE) e (NaCl) (Figura 15B). Porém, houve uma redução significativa no CRA das folhas das plantas que não foram pré-tratadas com NaCl e foram submetidas à seca (SECA) quando comparado com os demais tratamentos (Figura 15B), evidenciado também pelo murchamento das folhas (Figura 13). Após 48h de recuperação, não houve diferença estatística

significativa no CRA das folhas, entre todos os tratamentos analisados, recuperando assim seu turgor (Figura 15B).

Como pode ser observado na Figura 16A, a suculência foliar das plantas de *A. nummularia*, não diferiu durante as três semanas de seca/re-hidratação em todos os tratamentos analisados, com exceção das plantas que não foram pré-tratadas com NaCl e foram submetidas à seca (SECA), onde apresentaram uma redução significativa na suculência foliar durante o período de tratamento. A mesma tendência observada no CRA após 48h de recuperação, também foi vista na suculência das folhas que voltaram aos mesmos valores observados na primeira semana de tratamento, não apresentando diferença significativa entre todos os tratamentos analisados (Figura 16A).

A imposição de ciclos de seca/re-hidratação nas plantas de *Atriplex nummularia* provocaram uma aumento significativo no vazamento de eletrólitos tanto das plantas pré-tratadas com NaCl (NaCl + SECA), quanto das que não foram pré-tratadas com NaCl (SECA), como mostrado na Figura 16B. Mostrando assim, o efeito da desidratação nas membranas celulares. O mesmo não foi evidenciado, nas plantas que não sofreram a imposição à seca (CONTROLE e NaCl), onde não houve diferença significativa (Figura 16B). Após o tratamento de recuperação, houve então uma diminuição nos danos nas membranas nos tratamentos de seca, atingindo valores semelhantes aos das plantas que não foram submetidas à seca (Figura 16B).

Em relação ao conteúdo de sódio e cloreto das folhas de *Atriplex nummularia*, houve diferença estatística significativa entre a imposição da seca nas plantas que foram pré-tratadas ou não com NaCl. As plantas pré-tratadas com NaCl, mostraram um conteúdo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  aproximadamente duas vezes maiores que as plantas que não foram pré-tratadas com NaCl (Figura 17A). Não houve alteração significativa nos teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  das folhas com a imposição da seca, nas plantas pré-tratadas ou não com NaCl. Mostrando assim, que a seca *per se* não provocou alteração nos teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  das folhas de *A. nummularia* e sim o pré-tratamento com NaCl que provocou tais alterações.

Os teores de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{SO}_4^{-3}$  das folhas foram significavelmente reduzidos com a imposição da seca nas plantas pré-tratadas ou não com NaCl (Figura 17B, 18A, 18B e 18C). A redução nos teores de  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{-3}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  das folhas foi aproximadamente 15%, 18%, 33%, 50%, 70%, respectivamente. Não houve diferença significativa no conteúdo de  $\text{PO}_4^{-3}$  das folhas entre os tratamentos analisados (Figura 19A).

Não houve mudanças significativas no conteúdo de açúcares solúveis das folhas entre os tratamentos analisados (Figura 20A). A respeito dos teores de aminoácidos livres totais nas folhas percebe-se que as plantas que foram submetidas a ciclos de seca e/ou re-hidratação (SECA e NaCl + SECA) tiveram uma maior acumulação de aminoácidos quando comparadas com as outras plantas tratadas (Figura 20B). Os teores de proteínas solúveis foram superiores nas plantas pré-tratadas com NaCl e submetidas à seca, enquanto que o menor valor foi encontrado nas plantas pré-tratadas com NaCl e não expostas à seca (Figura 20C).

A imposição de ciclos sucessivos de seca/re-hidratação provocou um aumento significativo no conteúdo de prolina livre das folhas das plantas pré-tratadas ou não com NaCl (Figura 21A). Não houve diferença significativa entre os conteúdos de prolina das plantas (CONTROLE e NaCl) como mostra a Figura 21A. A Seca não provocou mudanças no conteúdo de glicina betaína das folhas, nas plantas que não foram pré-tratadas com NaCl (Figura 21B). Porém, o tratamento (NaCl + SECA) provocou um aumento significativo no conteúdo de glicina betaína (Figura 21B). Interessantemente, o tratamento (NaCl) não teve diferença significativa no conteúdo de glicina betaína quando se compara com as plantas que não foram pré-tratadas com NaCl (Figura 21B).

O tempo experimental de três semanas, provocou mudanças na osmolalidade total das folhas de *Atriplex nummularia* independentemente dos tratamentos de seca ou pré-tratamento com NaCl, pois as plantas do tratamento (CONTROLE) mostraram uma pequena tendência de aumento na osmolalidade total (Figura 22A). Entretanto a imposição da seca tanto nas plantas pré-tratadas ou não com NaCl ocasionou um significativo aumento na osmolalidade das folhas, o mesmo não ocorrendo nas plantas que foram tratadas apenas com NaCl onde a osmolalidade permaneceu constante durante os três ciclos de seca/re-hidratação (Figura 22A).

A tendência de aumento, verificada na osmolalidade total das folhas de *A. nummularia*, foi acompanhada por decréscimos significativos no potencial osmótico da folha, chegando a atingir valores extremamente negativos (- 7,04MPa) no tratamento (NaCl + SECA) (Figura 22B). Da mesma forma, as plantas tratadas somente com NaCl e não submetidas a seca não houve alteração no potencial osmótico da folha, apesar de apresentar um potencial inicial já bastante negativo (-4,65MPa) (Figura 22B). Após o período de recuperação de 48h, houve um restabelecimento da osmolalidade total e do potencial osmótico das folhas para condição inicial da primeira semana (Figura 22A e 22B).

Os três ciclos de seca/re-hidratação provocou o ajustamento osmótico das folhas de *A. nummularia*, independentemente do pré-tratamento com NaCl como mostra a Figura 23A. Interessantemente, as plantas que forma apenas tratadas com NaCl, teve uma diminuição no ajustamento osmótico das folhas durante as três semanas de tratamento salino (Figura 23A).

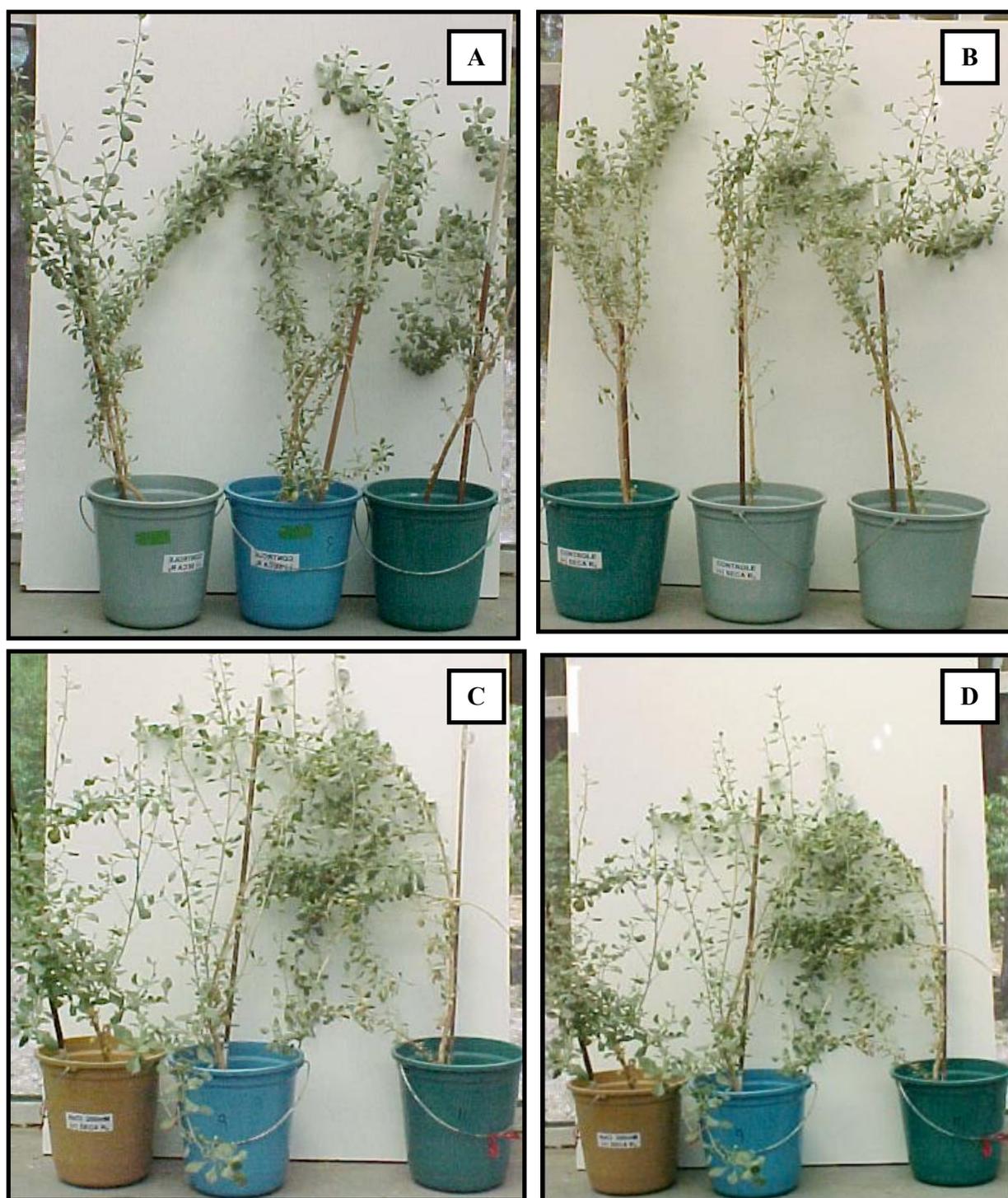
Em relação à contribuição relativa dos solutos inorgânicos para o ajustamento osmótico das folhas de *Atriplex nummularia*, estimada através do percentual da osmolalidade total, foi verificado que os íons salinos,  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$ , mostraram uma tendência de aumento na sua contribuição relativa com a imposição de todos os tratamentos, quando se compara com o tratamento controle (Figura 24 e Tabela 3). Entretanto os demais solutos inorgânicos analisados ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ), tiveram um decréscimo significativo no percentual de contribuição para a osmolalidade total das folhas com a imposição da Seca e do pré-tratamento com NaCl (Figura 24 e Tabela 3).

A maior parte da acumulação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  observada nas folhas das plantas não tratadas com NaCl e não expostas à seca, se deve a alta afinidade dessas células para íons salinos, especialmente para  $\text{Na}^+$  (25,9%) contra 25,3% do ( $\text{Cl}^-$ ), em termos da contribuição relativa para a osmolalidade total da folha. Em termos quantitativos, o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  foram os íons que mais contribuíram para o ajustamento osmótico das folhas de *Atriplex nummularia* em condições de deficiência hídrica, chegando a aproximadamente 32,2% e 30,4% da osmolalidade total das folhas, respectivamente, nas plantas pré-tratadas com NaCl e expostas à seca (Tabela 3).

Seguido dos íons salinos, o  $\text{K}^+$  foi o soluto inorgânico que mais contribuiu relativamente para osmolalidade total das folhas, porém mostrou um decréscimo significativo com a deficiência hídrica, variando de 10,4% nas plantas do tratamento controle, para aproximadamente 6% na plantas pré-tratadas com NaCl e submetidas a seca (Tabela 3). Após o  $\text{K}^+$ , os cátions bivalentes  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  também mostraram um decréscimo em seus conteúdos na folha, variando de 7,8% e 6,4%, respectivamente, nas plantas controle para 1,8% e 2,4% nas plantas tratadas NaCl e submetidas a seca (Tabela 3). A contribuição relativa de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  para o ajustamento osmótico das folhas das plantas de *A. nummularia* em condições de deficiência hídrica foi muito baixa, 3,5%, 1,3% e 1,1% ,respectivamente, nas plantas do

tratamento controle, diminuindo para 1,5%, 0,9% e 0,5%, respectivamente, NaCl e submetidas a seca (Tabela 3).

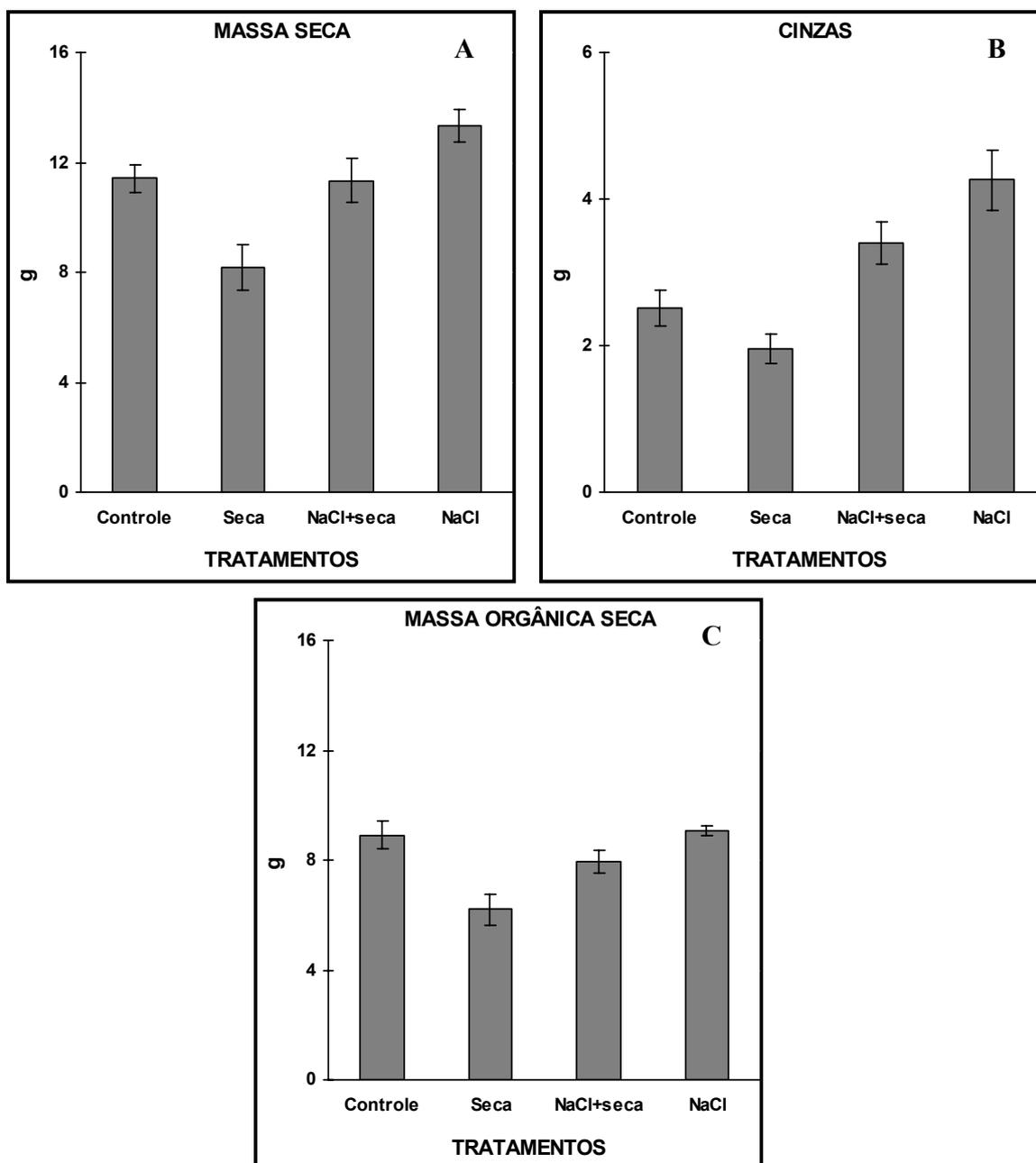
Com relação à contribuição relativa de solutos orgânicos para o ajustamento osmótico das folhas de *Atriplex nummularia* sob condições de seca, foi visto que a contribuição da glicina betaína (GB) foi maior que as dos demais solutos orgânicos analisados, variando de 8,4% da osmolalidade total, para 7,04% nas plantas tratadas com sal e submetidas a ciclos de seca/re-hidratação (Tabela 4). Assumindo que a GB está confinada no citosol da célula, que representa cerca de 10% do volume total da célula, essa contribuição efetiva para o ajustamento osmótico citosólico em condições de déficit hídrico, pode ser 10 vezes maior. Não houve mudanças no percentual de contribuição dos açúcares solúveis para o ajustamento osmótico das folhas de *Atriplex nummularia* com a seca independentemente do pré-tratamento com NaCl (Tabela 4). Houve um decréscimo no percentual da contribuição dos aminoácidos livres para o ajustamento osmótico com a imposição do tratamento de seca e pré-tratamento com NaCl (Tabela 4). Interessantemente, a contribuição relativa de prolina para a ajustamento osmótico das folhas aumentou com o tratamento de seca nas plantas que não foram pré-tratadas com NaCl e decresceu o pré-tratamento salino, apesar do percentual de contribuição na seca ser irrisório (0,040%) (Tabela 4).



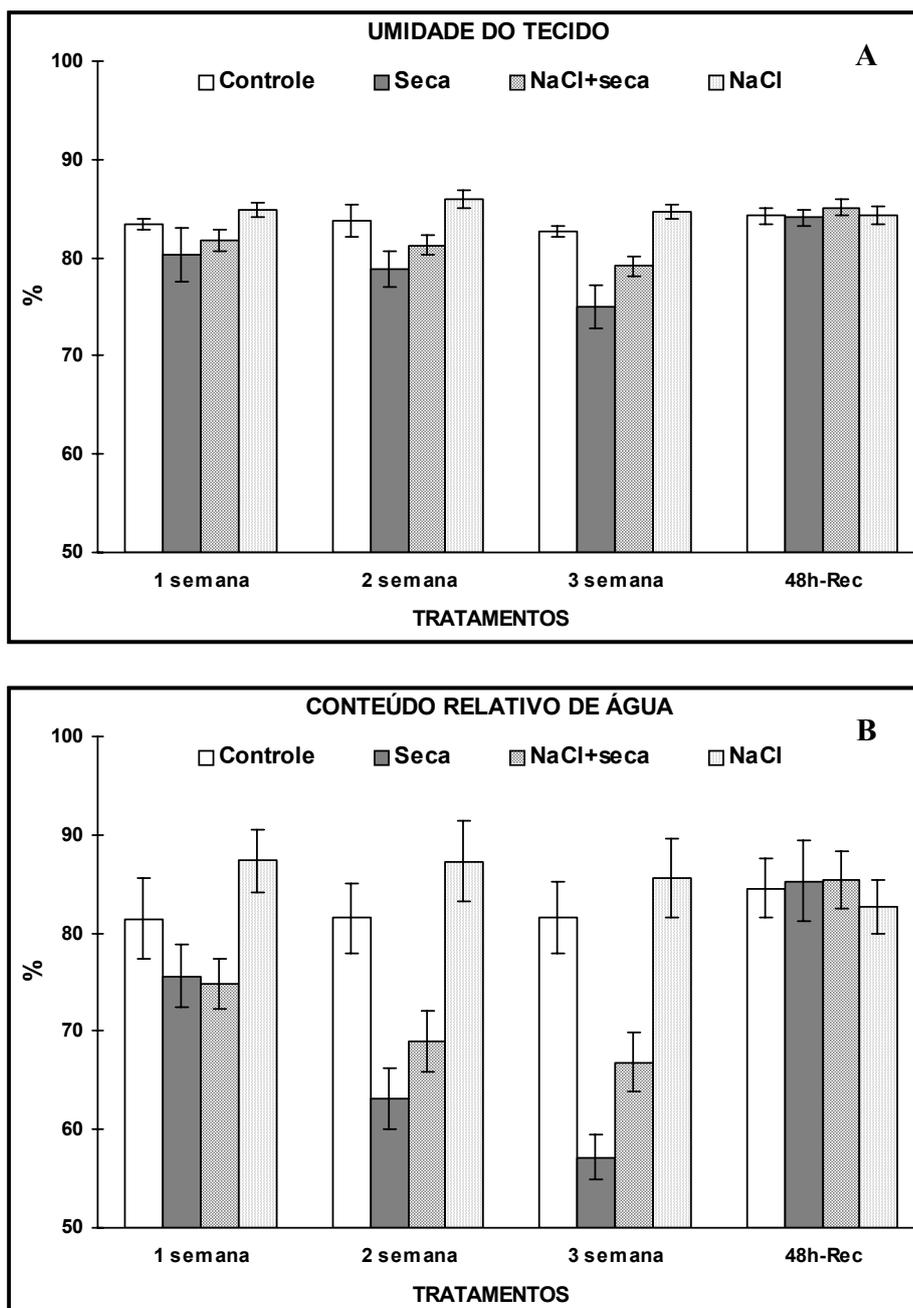
**Figura 12** - Aspecto visual das plantas de *Atriplex nummularia* após 48h de recuperação de três ciclos sucessivos de seca/re-hidratação. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (Controle) (A) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (Seca) (B) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (NaCl+seca) (C) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (NaCl) (D) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental.



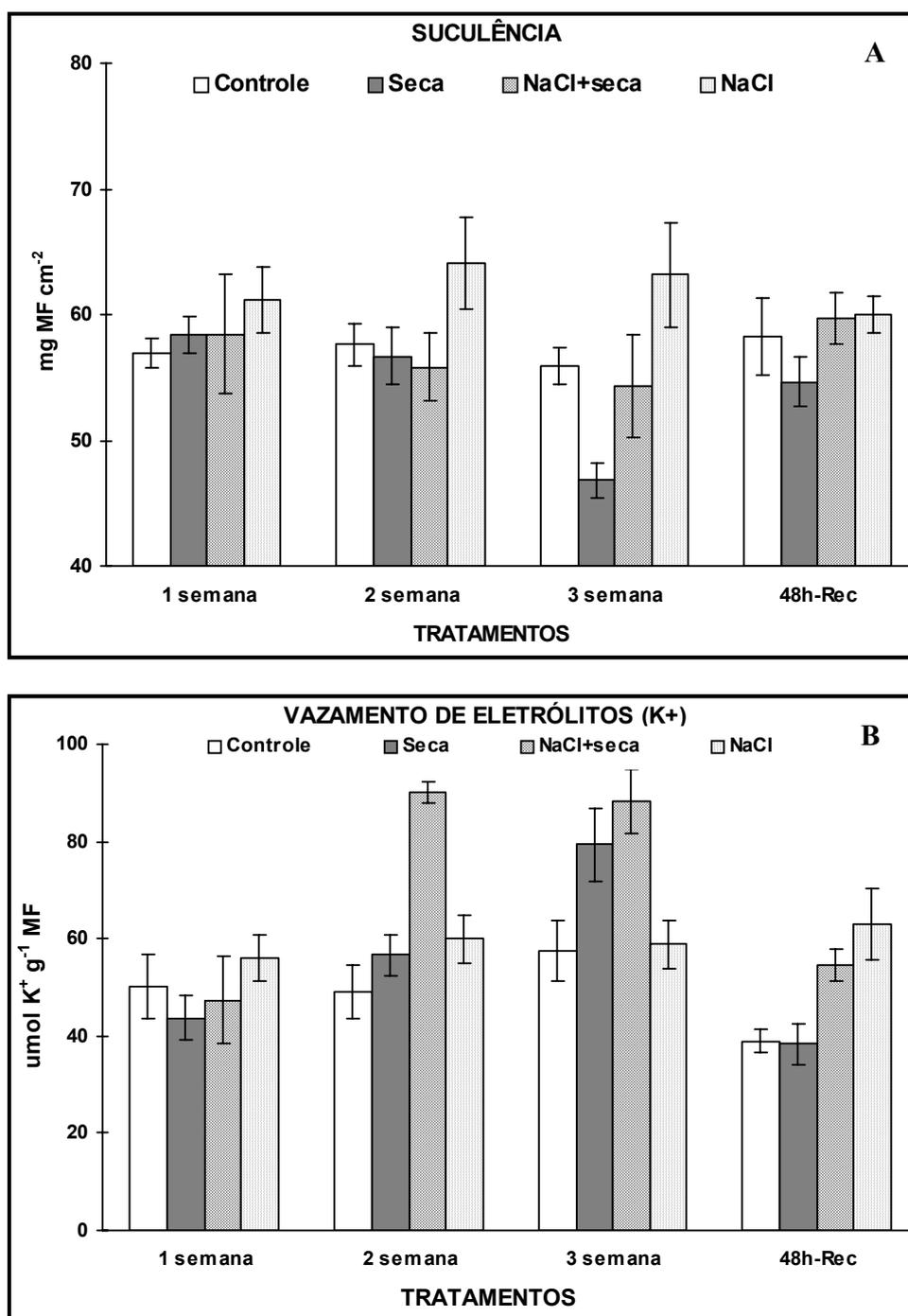
**Figura 13** – Perda de turgor das folhas das plantas de *Atriplex nummularia* não pré-tratadas com NaCl e expostas a três ciclos sucessivos de seca/re-hidratação.



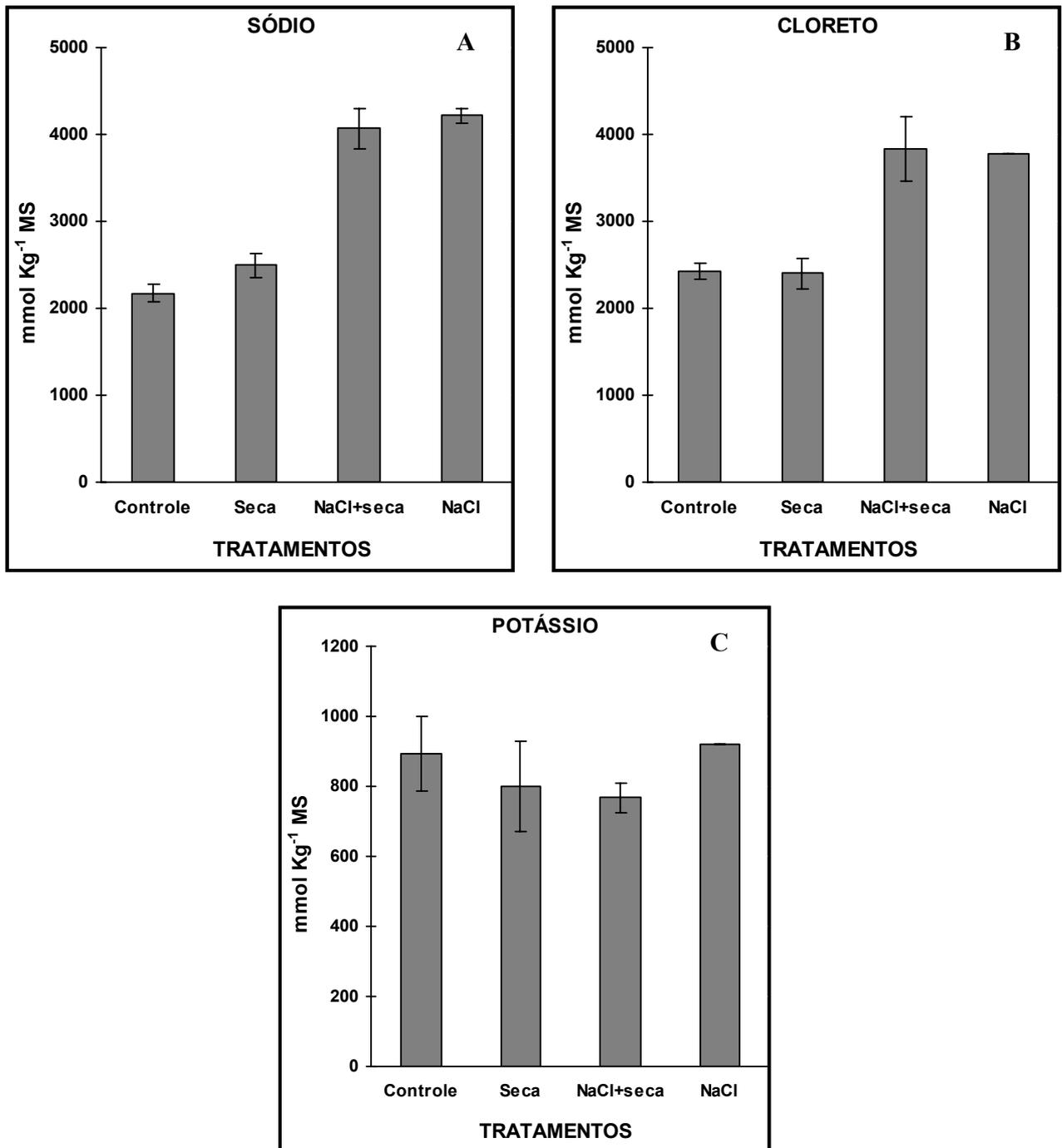
**FIGURA 14** – Variação na massa seca (A), cinzas (B) e massa orgânica seca (C) das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (**Controle**) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (**Seca**) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (**NaCl+seca**) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (**NaCl**) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



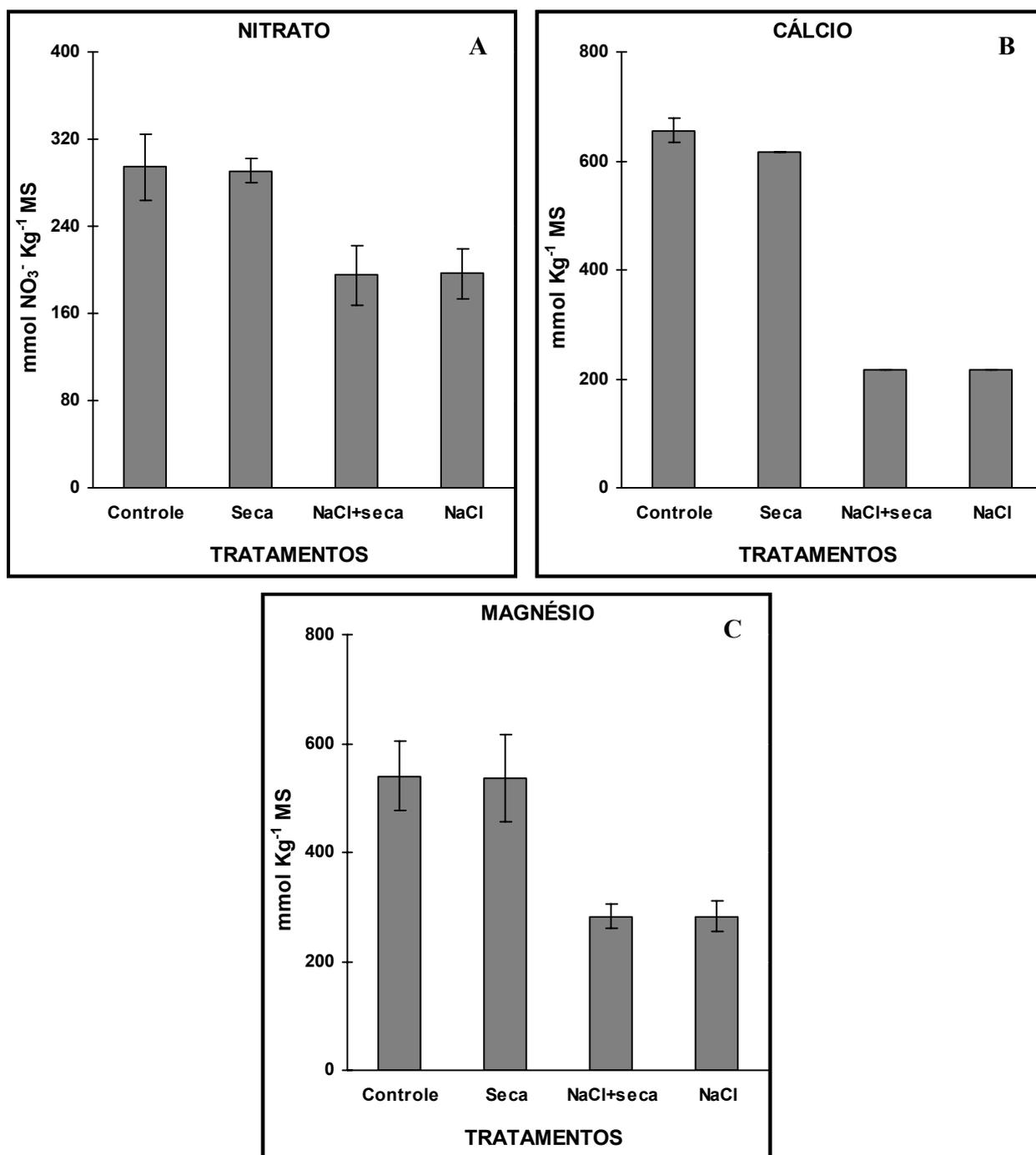
**FIGURA 15** – Variação na umidade (A) e no conteúdo relativo de água (B) das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: **(Controle)** corresponde ao controle irrigado a cada três dias; **(Seca)** são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; **(NaCl+seca)** são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e **(NaCl)** corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



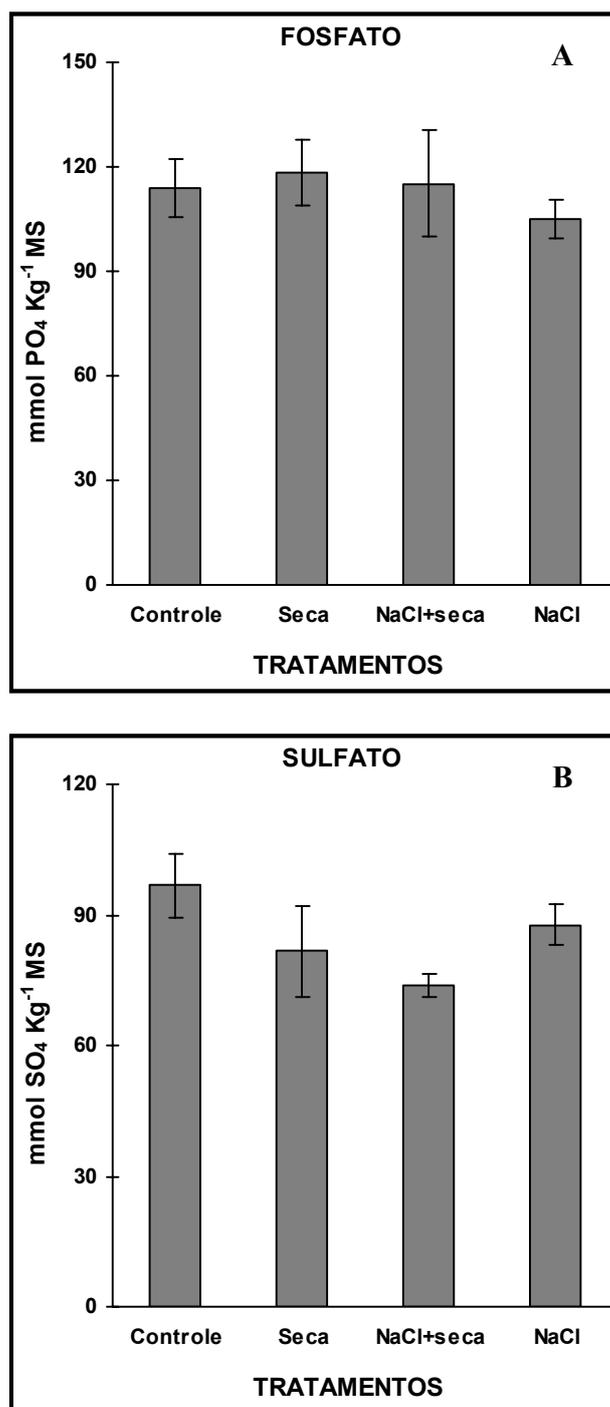
**FIGURA 16** – Variação na succulência e no vazamento de eletrólitos das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (**Controle**) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (**Seca**) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (**NaCl+seca**) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (**NaCl**) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



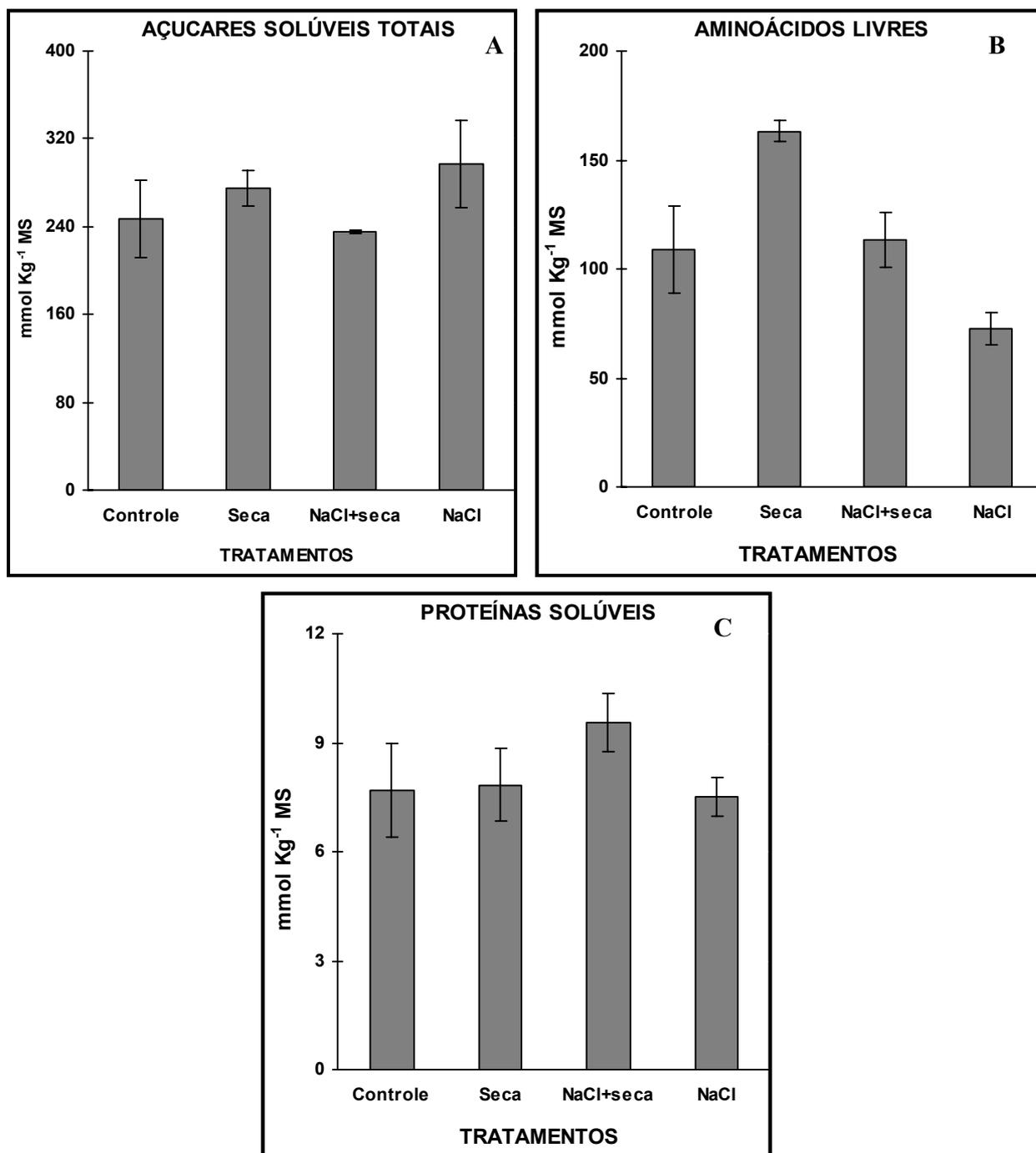
**FIGURA 17** – Variação no conteúdo de Sódio (A), Cloreto (B) e potássio (C) das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: **(Controle)** corresponde ao controle irrigado a cada três dias; **(Seca)** são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; **(NaCl+seca)** são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e **(NaCl)** corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



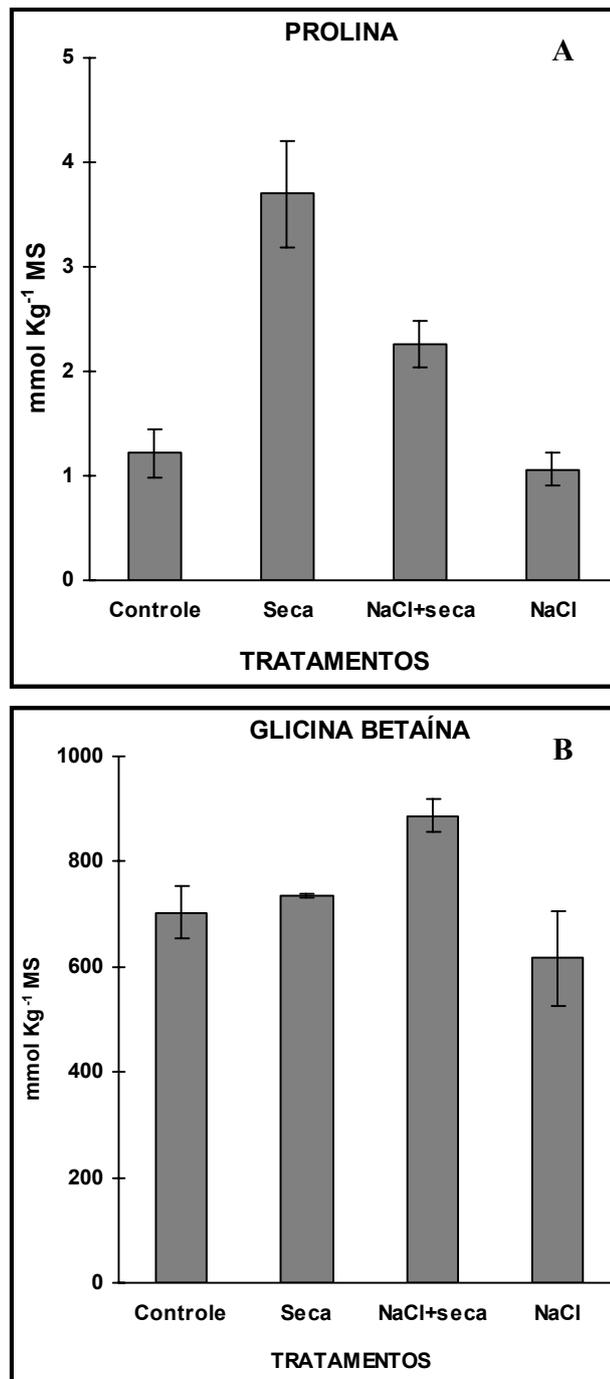
**FIGURA 18** – Variação no conteúdo de nitrato (A), cálcio (B) e magnésio (C) das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (**Controle**) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (**Seca**) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (**NaCl+seca**) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (**NaCl**) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



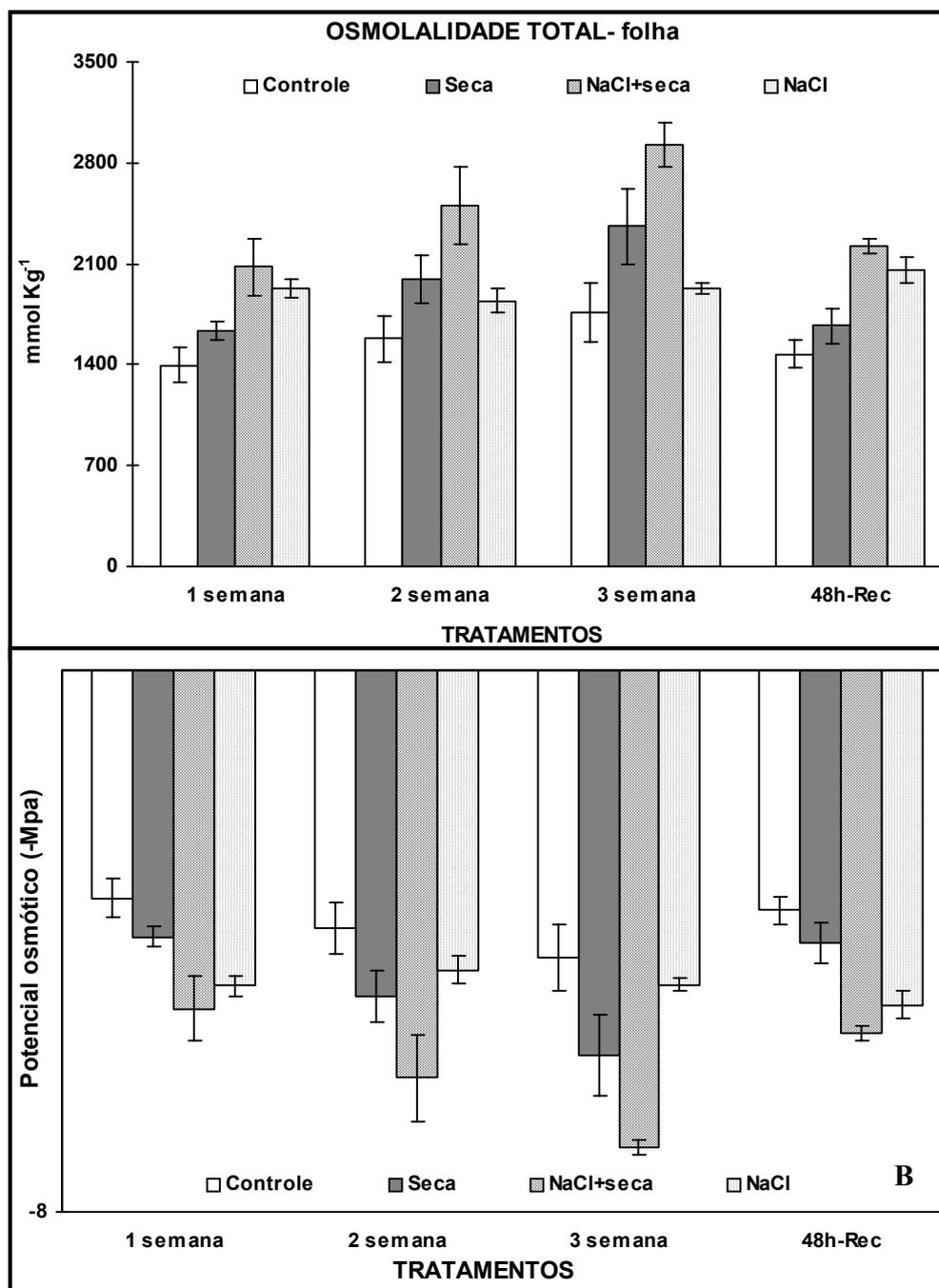
**FIGURA 19** – Variação no conteúdo de fosfato (A) e sulfato (B) das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (**Controle**) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (**Seca**) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (**NaCl+seca**) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (**NaCl**) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



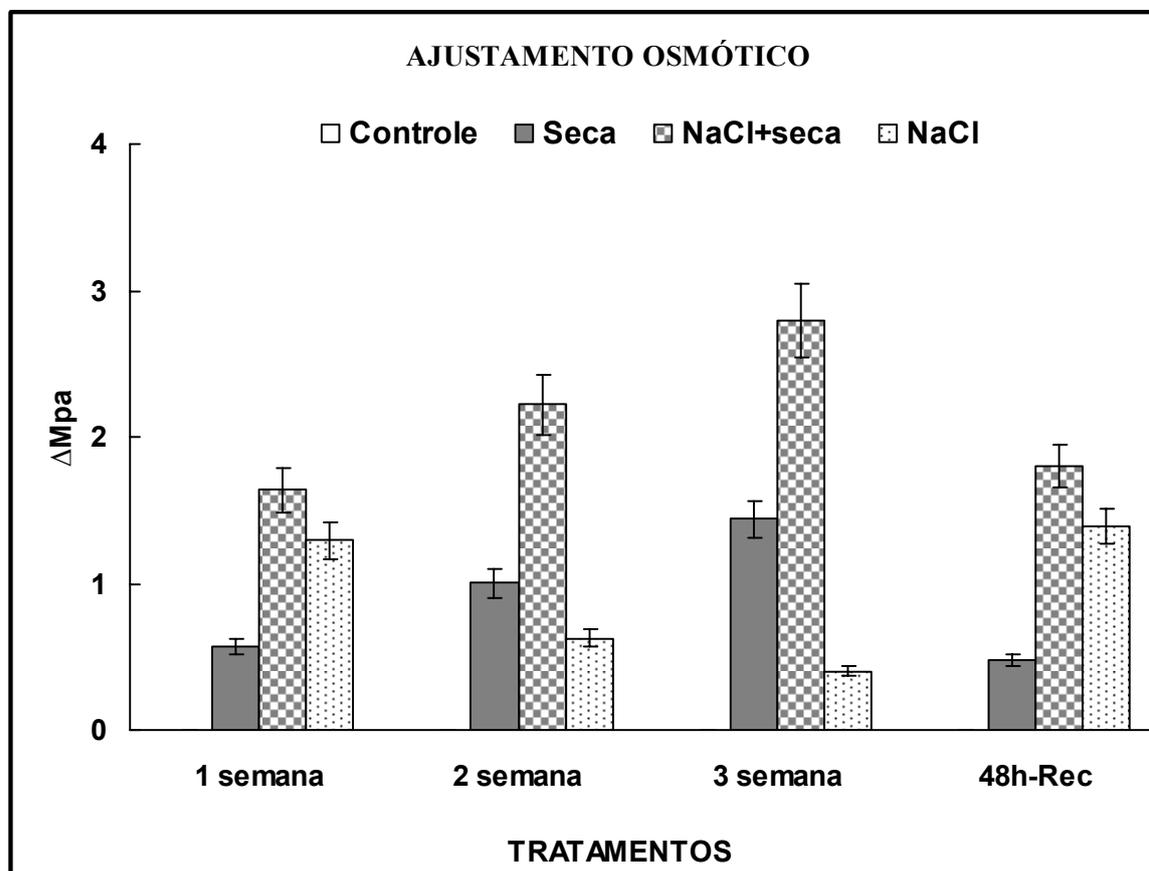
**FIGURA 20** – Variação no conteúdo de açúcares solúveis (A), aminoácidos livres (B) e proteínas solúveis (C) das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (**Controle**) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (**Seca**) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (**NaCl+seca**) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (**NaCl**) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



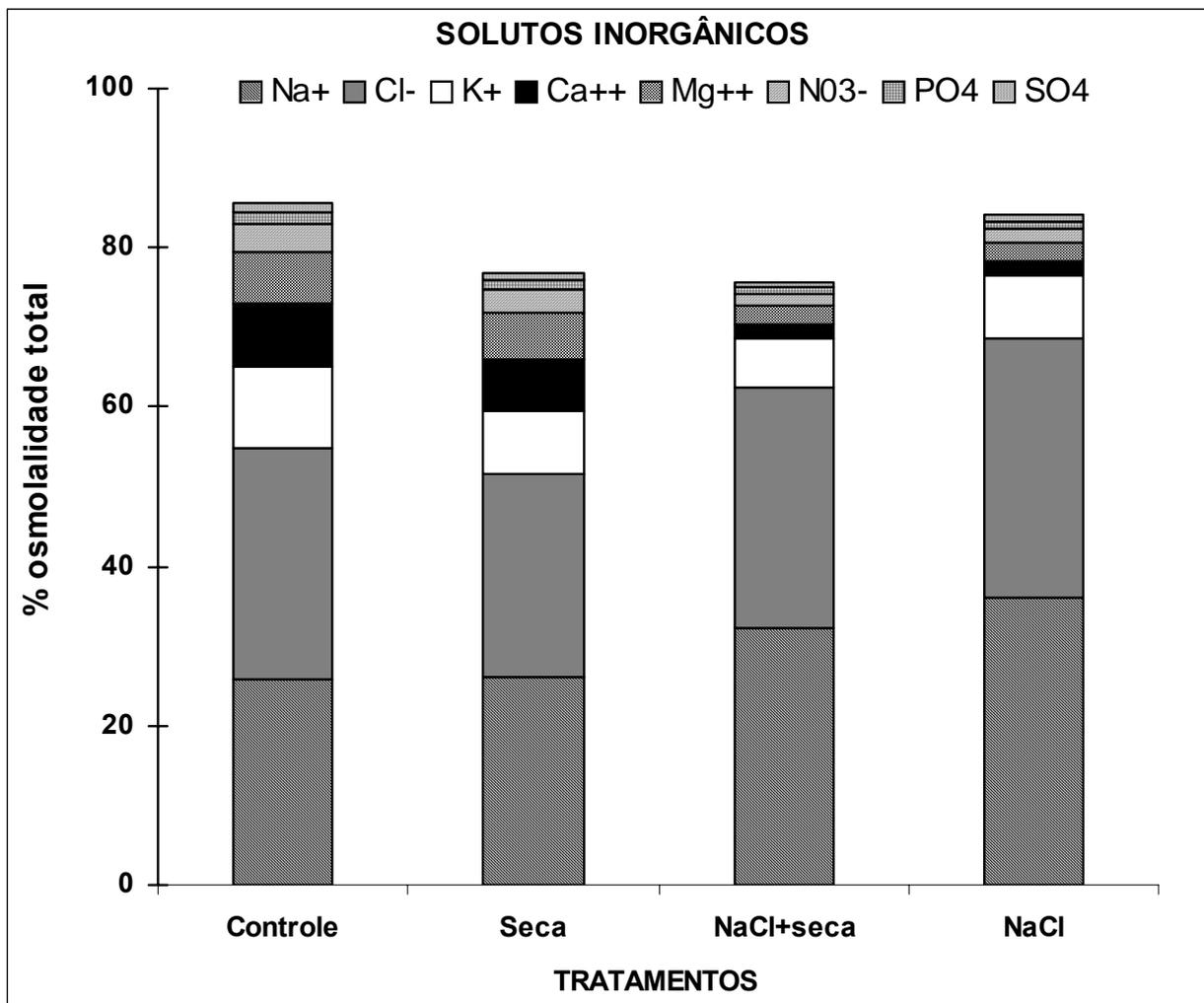
**FIGURA 21** – Variação no conteúdo de prolina (A) e glicina betaína (B) das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: **(Controle)** corresponde ao controle irrigado a cada três dias; **(Seca)** são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; **(NaCl+seca)** são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e **(NaCl)** corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, A diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



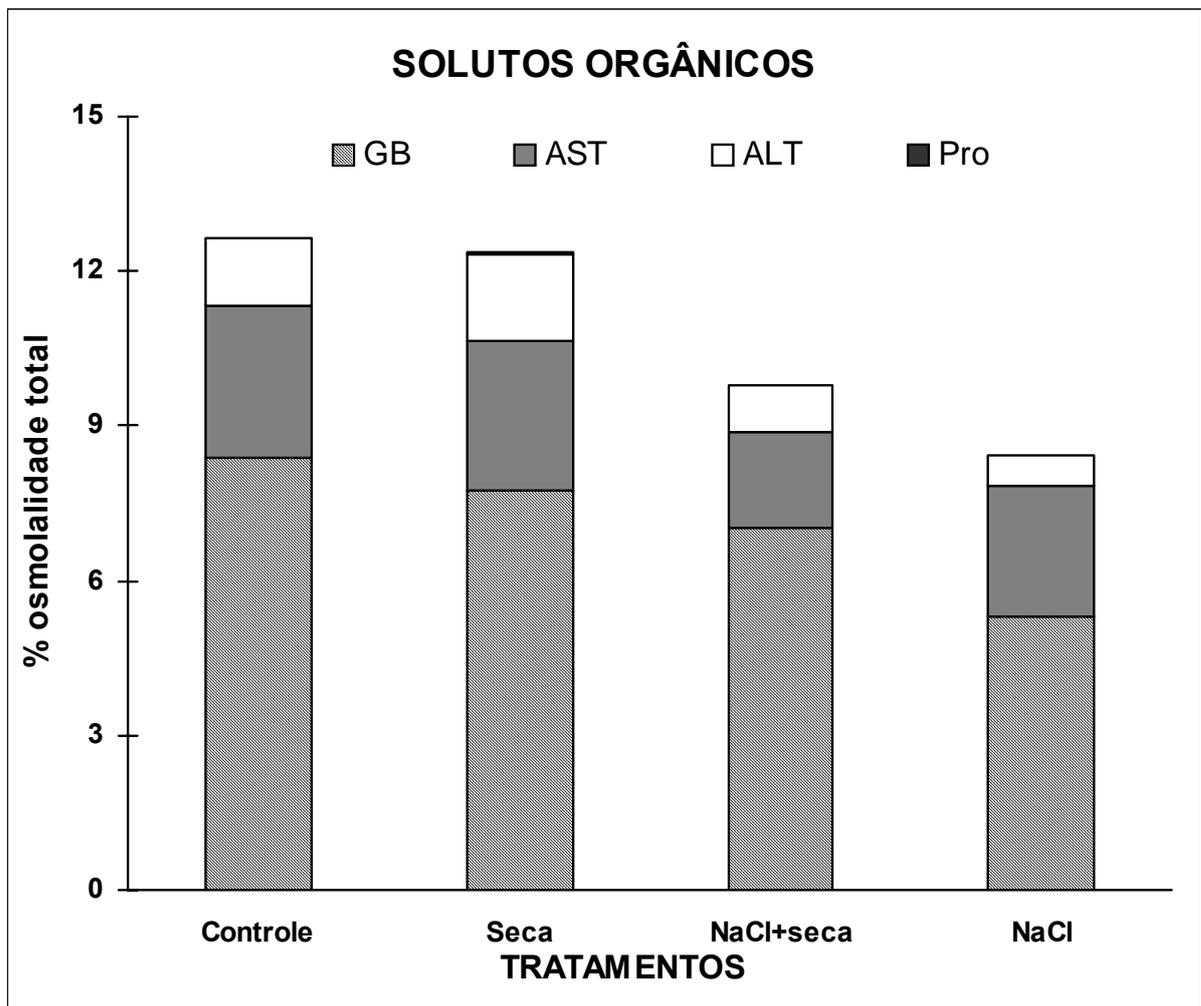
**FIGURA 22** – Variação na osmolalidade total (A) e no potencial osmótico (B) das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (**Controle**) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (**Seca**) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (**NaCl+seca**) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (**NaCl**) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



**FIGURA 23** – Variação no conteúdo de prolina (A) e glicina betaína (B) das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (**Controle**) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (**Seca**) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (**NaCl+seca**) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (**NaCl**) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



**FIGURA 24** – Contribuição relativa de solutos inorgânicos na osmolalidade total das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (**Controle**) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (**Seca**) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (**NaCl+seca**) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (**NaCl**) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)



**FIGURA 25** – Contribuição relativa de solutos orgânicos na osmolalidade total das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (**Controle**) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (**Seca**) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (**NaCl+seca**) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (**NaCl**) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições. (\*Letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, através do teste de Tukey)

Tabela 4 - Contribuição relativa de solutos inorgânicos na osmolalidade total das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (Controle) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (Seca) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (NaCl+seca) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (NaCl) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições.

Tratamentos	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>
[NaCl] mM				%				
Controle	25,945	25,3	10,38	7,83	6,44	3,51	1,36	1,15
Seca	26,24	28,9	8,075	6,48	5,64	3,06	1,24	0,85
NaCl + seca	32,22	30,38	6,08	1,71	2,24	1,54	0,91	0,58
NaCl	36,14	32,39	7,89	1,85	2,42	1,68	0,9	0,75

Tabela 5 - Contribuição relativa de solutos orgânicos na osmolalidade total das folhas de *Atriplex nummularia* expostas à seca durante três ciclos de desidratação seguidos por irrigação ao final de cada ciclo. No último ciclo, as plantas foram todas irrigadas e após 48h de recuperação foram colhidas. Os tratamentos correspondem respectivamente a: (Controle) corresponde ao controle irrigado a cada três dias; (Seca) são plantas não pré-tratadas com NaCl e expostas a seca; (NaCl+seca) são as plantas pré-tratadas com 200 mM de NaCl e expostas a seca e (NaCl) corresponde as plantas sempre tratadas com 200 mM de NaCl durante todo período experimental. Os valores representam médias de quatro repetições.

Tratamentos	Glicina betaína	Açúcares solúveis	Aminoácidos livres	prolina
[NaCl] mM			%	
Controle	8,39	2,95	1,30	0,014
Seca	7,74	2,89	1,71	0,038
NaCl + seca	7,04	1,86	0,89	0,017
NaCl	5,28	2,54	0,62	0,009

#### 4.4 – DISCUSSÃO

As espécies xero-halófitas originadas dos desertos australianos, dentre elas a *Atriplex nummularia*, são frequentemente pensadas como sendo bem adaptadas a solos áridos (seca) e halomórficos (presença de sais), ambiente este extremamente hostil à maioria das plantas, quer sejam cultivadas ou não. No entanto, existem poucos estudos que levem em consideração a combinação dos efeitos tanto do estresse salino como da seca nestas espécies de halófitas (Glenn & Brown, 1998; Martínez et al., 2005).

Apesar de estudos, sugerirem que as vias que conduzem os estímulos da seca e do estresse salino são interconectadas pelos estresses primários e pelas respostas conferidas (homeostase, desintoxicação e controle do crescimento) (Knight & Knight, 2001). Investigando a ocorrência simultânea do estresse hídrico e salino em *Atriplex canescens*, Glenn & Brown (1998) concluíram que os efeitos de ambos os estresses, não são estritamente aditivos na redução da performance da planta e que a tolerância ambos os estresses está ligada a um mecanismo comum de absorção de  $\text{Na}^+$  para o ajustamento osmótico.

O crescimento celular parece ser a resposta mais sensível ao estresse hídrico. O estresse hídrico é um expressivo problema para a produção vegetal, pois existe um efeito inibitório na acumulação de biomassa (Nonami *et al.*, 1997; Mullet & Whitsitt, 1996). A inibição da expansão celular é comumente seguida por uma redução na síntese de parede celular (Salisbury & Ross, 1992). O processo de crescimento celular, através da síntese de proteínas e de parede celular, é o mais sensível às reduções na disponibilidade de água nos tecidos (Salisbury & Rossi, 1991; Nobel, 1992). Entretanto, os mecanismos moleculares que respondem às reduções no potencial de água e que desencadeiam os processos responsáveis pela paralisação do alongamento celular, ainda não são bem entendidos. Acredita-se que, tais processos, são mediados pelo ácido abscísico (ABA), o qual é encontrado em grande quantidade, durante o estresse hídrico (Bray, 1993; Ingram & Bartels, 1996).

No presente estudo, a seca foi capaz de reduzir a massa seca das folhas das plantas que não foram pré-tratadas com NaCl, o mesmo não foi evidenciado nas plantas que foram pré-tratadas com NaCl (Figura 14A), mostrando que o pré-condicionamento das plantas de *Atriplex nummularia* foi capaz de atenuar os efeitos da deficiência hídrica. O NaCl estimulou a produção de biomassa, mesmo nas plantas submetidas a ciclos de seca (NaCl -H<sub>2</sub>O), o que mostra o efeito altamente benéfico do  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na nutrição destas plantas (Araújo, 2003), tendo em vista que

esta espécie halófito é do tipo incluidora de sais. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Reimann & Breckle (1993), que observou que em *A. acuminata* e *A. rosea*, mais de 70% do conteúdo de Na<sup>+</sup> total destas plantas estão localizados nas folhas.

A essencialidade de Na<sup>+</sup> como micronutriente tem sido bem estabelecido para *Atriplex vesicaria*, o Na<sup>+</sup> é um micronutriente em sentido estrito para as plantas C<sub>4</sub>, mas não para as plantas C<sub>3</sub> (Brownell, 1965). Em algumas espécies de halófitas, como a *Halogeton glomeratus*, uma erva daninha, essa espécie tem uma necessidade tão elevada de sal que o Na<sup>+</sup> pode ser considerado um macronutriente (Williams, 1960). Em espécies C<sub>4</sub>, como por exemplo, *A. nummularia*, o Na<sup>+</sup> pode tanto influenciar na fase fotoquímica e bioquímica da fotossíntese, estando envolvido no transporte de piruvato dentro do mesófilo dos cloroplastos (Ohnishi *et al.*, 1990; Aoki *et al.*, 1992) e mantendo a integridade funcional através da influência direta sobre o empilhamento das membranas dos tilacóides (Groef *et al.*, 1989; Brownell & Bielig, 1996). Para Murata *et al.*, 1992 a maioria das espécies C<sub>4</sub> requerem Na<sup>+</sup> em pequenas quantidades para converter piruvato em fosfoenolpiruvato em condições de baixa luminosidade.

Mesmo em condições de deficiência hídrica o pré-tratamento com NaCl foi capaz de manter o crescimento das plantas de *Atriplex nummularia*, talvez pela economia do uso da água muito comum nessa espécie de halófito. Koyro, (2006) trabalhando com a halófito *Plantago coronopus*, submetidas a diferentes percentagens da água do mar (0%, 25%, 50% e 75%) e da própria água do mar (100%) verificou que houve um aumento na eficiência da água com incremento da salinidade. Resultados similares foram também obtidos por Araújo, (2003) trabalhando com doses crescentes de NaCl, com *A. nummularia* o que mostra a economia de água desta espécie em situação de estresse salino.

Ressalte-se que mesmo em condição de seca, as plantas pré-tratadas com NaCl apresentaram um teor de cinzas e uma massa orgânica das folhas igual ou superior ao das plantas que não foram pré-tratadas com sal (Figura 14B e 14C), o que comprova que o NaCl aumenta a habilidade destas plantas em conviver à condições de deficiência hídrica. Martínez *et al.*, (2003) conclui que em *A. halimus*, a resistência ao estresse hídrico estimada pela produção de biomassa, pode estar associada com o alto uso eficiência da água do que propriamente com ajustamento osmótico, e que o Na<sup>+</sup> pode assumir uma função fisiológica específica nesta espécie C<sub>4</sub> xero-halófito.

Em condições de deficiência hídrica, a habilidade das plantas em manter o status hídrico das células (ajustamento osmótico) e a integridade celular pode ser uma vantagem adaptativa. Mudanças nas propriedades de elasticidade do tecido e na concentração de solutos podem promover a manutenção do turgor e volume celular apesar do baixo potencial hídrico (Ayoub *et al.*, 1992). A manutenção do turgor durante mudanças no status hídrico da planta pode preservar processos metabólicos da planta e contribuir para o crescimento em condições de escassez de água. As plantas de *Atriplex nummularia* pré-condicionadas com NaCl foram capazes de manter o seu status hídrico mesmo em condições de seca, mostrando uma umidade, conteúdo relativo de água (CRA) e a suculência das folhas superiores às apresentadas pelas plantas que não foram pré-tratadas com NaCl e foram submetidas à seca na terceira semana de tratamento (Figura 15 e 16A). A suculência foliar não diferiu na primeira e segunda semana e recuperação, sendo somente diferente na terceira semana entre os tratamentos. A manutenção de um alto conteúdo relativo de água em condições de déficit hídrico é usualmente bem correlacionada com a produção de biomassa (Teulat *et al.*, 1997).

A alta suculência foliar e um alto conteúdo relativo de água é uma estratégia adaptativa que contribui para a regulação da concentração iônica interna em muitas halófitas diante de condições ambientais adversas (Short & Colmer, 1999). Cabe salientar que em situações de alta salinidade, uma das estratégias lançadas por plantas halófitas para conviver com este ambiente hostil é o aumento da suculência da planta (Waisel, 1972). Não obstante, neste presente estudo, como observado na Figura 16A, O que mostra provavelmente uma ação da seca fazendo com suculência das plantas pré-tratadas (NaCl -H<sub>2</sub>O) fossem menor. Uma outra explicação seria os próprios níveis endógenos de Na<sup>+</sup> das plantas de *Atriplex* (Gale & Poljakoff-Mayber, 1970), que são elevados, interferindo assim na suculência foliar principalmente das plantas que não foram pré-tratadas com sal.

A perda de turgor das folhas das plantas de *A. nummularia* submetidas à seca e que não foram pré-condicionadas com NaCl pode também ser evidenciado pelo murchamento e aspecto morfológico (Figura 13). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Martínez *et al.*, (2003) trabalhando *A. halimus* verificou uma diminuição acentuada do CRA destas plantas quando submetidas à deficiência hídrica. Martínez *et al.*, (2005) trabalhando com a mesma espécie (*A. halimus*) em situação de salinidade e seca encontraram resultados semelhantes. O tratamento de recuperação de 48h de re-hidratação de todas as plantas com água

destilada foi capaz de reverter às mudanças ocasionadas pela seca umidade, CRA e suculência das folhas em todos os tratamentos.

Apesar das plantas de *Atriplex nummularia* ter mostrado um maior conteúdo hídrico nas folhas com o pré-tratamento com NaCl durante os três ciclos de seca/re-hidratação, isso não foi correlacionado com o vazamento de eletrólitos, que estima o grau de integridade das membranas celulares, pois o mesmo também foi aumentado significativamente nessas plantas (Figura 16B). Talvez a interação dos efeitos do sal e da seca tenha provocado danos irreversíveis nas membranas das células, apesar de que após o período de recuperação de 48h ocorreu uma redução nesse vazamento de eletrólitos, atingindo valores iguais aos observados no início do tratamento.

Conforme observado na Figuras 17, que relata os teores de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  nas folhas, percebeu-se diferenças nos teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  entre os grupos de plantas não pré-tratadas com NaCl (CONTROLE e SECA) e o grupo de plantas pré-tratadas com NaCl (NaCl + SECA e NaCl). Como era de se esperar, nas plantas onde houve a presença de NaCl houveram incrementos substanciais nos teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , enquanto os teores de  $\text{K}^+$  praticamente não sofreu alterações nos dois grupos de plantas demonstrando assim que este nutriente possa ter sido utilizado para manutenção do turgor dessas plantas nessas condições de deficiência hídrica. O  $\text{K}^+$  é um componente essencial para o ajustamento osmótico celular e principalmente para o fenômeno de abertura e fechamento estomático (Maathuis & Amtmann, 1999). Existem vários estudos sobre o comportamento do  $\text{Na}^+$  na nutrição de plantas do gênero *Atriplex*, mas usualmente esses estudos levam somente em consideração condições de salinidade e não de deficiência hídrica (Mozafar & Goodin, 1970; Storey et al., 1983; Glenn et al., 1996; Wilson et al., 2000; Araújo, 2003).

Em experimento conduzido por Glenn & Brown, (1998) trabalhando com *Atriplex canescens*, investigando a ocorrência simultânea do estresse salino e hídrico, concluíram que os efeitos de ambos os estresses não são aditivos para redução da performance da planta. E que a tolerância ao estresse salino e hídrico está ligada através de um mecanismo comum de absorção de  $\text{Na}^+$  para promoção do ajustamento osmótico. Martínez et al., (2005) trabalhando com *Atriplex halimus* encontrou efeito benéfico do  $\text{Na}^+$  em aliviar danos causados pelo polietileno glicol 6000

(PEG 6000), um indutor artificial de seca, confirmando que o  $\text{Na}^+$  está envolvido na resistência ao estresse hídrico.

Os níveis de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  das folhas das plantas pré-tratadas com NaCl submetidas ou não à seca, foi significativamente decrescidos. Ou seja, isso mostra que a seca *per si* não foi capaz de reduzir o conteúdo desses solutos inorgânicos da folha, sendo o NaCl o principal agente causador desses decréscimos acentuados observado nas folhas das plantas de *Atriplex nummularia* tratadas com NaCl (Figura 18). É interessante ressaltar que não houve diferenças estatísticas dentro de cada grupo demonstrando assim que a seca não influenciou na nutrição destes íons.

Tem sido sugerido que o tratamento com NaCl provoca o decréscimo significativo da concentração de  $\text{NO}_3^-$  das folhas de não halófitas (Gouia *et al.*, 1994; Botella *et al.*, 1997) e isto pode ser devido ao antagonismo entre  $\text{NO}_3^-$  e o  $\text{Cl}^-$  (Bottacin *et al.*, 1985) ou a interferência do NaCl externo com um ou mais tipos de transportadores na membrana plasmática de células da raiz (Stientra, 1986). O aumento do conteúdo de  $\text{Na}^+$  provocado pelo NaCl pode também influenciar nesse decréscimo das concentrações de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  observadas somente nas folhas das plantas pré-tratadas pois influencia nas relações  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{+2}$  no tecido vegetal, podendo provocar assim um desbalanço nutricional na planta (Rogers & Noble, 1992; Ullah *et al.*, 1993). Quanto aos teores dos ânions  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $\text{SO}_4^{-2}$  das folhas, percebeu-se que os teores de  $\text{PO}_4^{-3}$  permaneceram constantes em todos os três tratamentos, enquanto que os teores de  $\text{SO}_4^{-2}$  teve uma discreta diminuição com a seca, apesar de não ser significativo (Figura 19).

Em condições de deficiência hídrica, várias espécies vegetais exibem aumento nas concentrações de substâncias nitrogenadas como prolina, betaínas, citrulinas (Rabe, 1993), além de sacarose e açúcares-álcoois, como o pinitol (Ingram & Bartels, 1996), utilizando-os como estratégia para o ajustamento osmótico e prevenção da perda de água e subsequente desidratação celular (Handa *et al.*, 1986). Neste estudo não houve mudanças significativas no conteúdo de açúcares solúveis das folhas com a imposição do tratamento de seca em todos os tratamentos analisados (Figura 20A). Quanto ao conteúdo de aminoácidos livres e as proteínas solúveis verificou-se uma suave tendência de aumento nas plantas sob seca que não foram pré-tratadas com NaCl (SECA), o que sugere uma possível utilização destes aminoácidos como precursores de outros osmoprotetores no sentido de proteger a planta contra os danos nocivos causado pela seca.

A seca promoveu o aumento significativo do conteúdo de prolina das folhas das plantas independentemente do pré-condicionamento com NaCl como pode ser evidenciado na Figura 21A. Estudos evidenciam que a prolina tem um importante papel na tolerância a seca de xero-halófitas (Wang *et al.*, 2004). Entretanto o acúmulo de prolina, não esteve envolvido com o ajustamento osmótico de plantas de *Atriplex halimus* sob estresse hídrico, pois seu conteúdo em folhas foi relativamente baixo e não foi modificado em resposta ao déficit hídrico, enquanto o conteúdo relativo de água e o potencial osmótico foram significativamente decrescidos (Martinez *et al.*, 2004). Porém em condições de estresse salino, Bajji *et al.* (1998) observou um aumento nos níveis de prolina nas folhas de *Atriplex halimus*. Sugerindo que as alterações devido ao estresse hídrico, são menos importantes que os danos ocasionados pelo sal ou talvez que os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> podem ter um efeito tóxico adicional provocando assim diretamente a over-produção de prolina independente do componente osmótico do estresse salino. Entretanto essa hipótese não se foi relacionada com o observado em nosso estudo.

A acumulação de glicina betaína em plantas tem sido frequentemente registrada sob condições de estresse hídrico e salino, tendo sido usualmente considerada ter um efetivo papel fisiológico na osmorregulação de compartimentos citoplasmáticos celulares, na proteção de proteínas e na estabilização de membranas nessas condições adversas (Sakamoto & Murata, 2000). Espécies de família Chenopodiaceae, do qual faz parte a *Atriplex nummularia*, produzem glicina betaína em resposta ao estresse hídrico e salino (Marcum & Murdoch, 1992). Entretanto, neste trabalho as plantas de *Atriplex nummularia* não acumularam significativamente GB nas folhas em resposta à seca, como já demonstrado em outros trabalhos. Neste estudo, apenas o tratamento de seca nas plantas que foram pré-tratadas com NaCl é que provocou o aumento nas concentrações de GB nas folhas. Evidências circunstanciais indicam que a acumulação de glicina betaína induzida pelo estresse é adaptativa, desde que pode funcionar como um osmótico compatível ou um osmoprotetor. Em *Atriplex halimus*, houve um aumento considerável na concentração de glicina betaína nas folhas em resposta ao estresse hídrico (Martinez *et al.*, 2004).

O ajustamento osmótico (AO) é definido como a diminuição do potencial hídrico da planta devido à acumulação líquida de solutos em resposta ao estresse hídrico, pode servir como um mecanismo de tolerância à seca em várias espécies vegetais (Blum, 1989; Zhang *et al.*, 1999; Chimenti *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Neste trabalho as plantas de *Atriplex nummularia* sofreram mudanças significativas na osmolalidade total e no potencial osmótico das folhas

durante os três ciclos sucessivos de seca/re-hidratação como mostrado na Figura 22. A interação entre o pré-tratamento com o NaCl e o posterior tratamento de seca provocou um aumento significativo na osmolalidade total das folhas no decorrer dos ciclos de seca/re-hidratação, isto sendo acompanhado igualmente por decréscimos significativos no potencial osmótico das folhas. Diversos estudos têm demonstrado que espécies do gênero *Atriplex* são capazes de diminuir seu potencial osmótico em condições de estresse hídrico e salino, com o intuito de se ajustar osmoticamente para garantir assim a absorção de água nessas condições adversas (Bajji *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2005).

Porém não houve uma correlação entre o ajustamento osmótico e a produção de biomassa em *Atriplex halimus* sob condições de estresse hídrico (Martinez *et al.*, 2004). Sob condições de seca, a manutenção do turgor da célula pode ocorrer pelo ajustamento osmótico por uma acumulação líquida de solutos para obter um gradiente favorável de potencial hídrico. Em adição, o acúmulo destes compostos no citoplasma pode proteger as membranas celulares, as proteínas e a maquinaria metabólica, o que pode preservar a estrutura subcelular dos danos resultantes da desidratação (Serraj & Sinclair, 2002). Neste trabalho a interação entre o pré-condicionamento com NaCl e a imposição de ciclos sucessivos de seca/re-hidratação foram capazes de provocar um ajustamento osmótico nas folhas de *Atriplex nummularia*, como pode ser evidenciado pelo gradiente ocorrido entre o potencial osmótico das plantas desse tratamento em relação aos demais tratamentos (Figura 23). Esse ajustamento osmótico nas folhas foi corroborado pelas mudanças significativas na osmolalidade total e no potencial osmótico.

Em espécies pertencentes ao Gênero *Atriplex* ambos, o  $K^+$  e o  $Na^+$  estão envolvidos no ajustamento osmótico de tecidos foliares submetidos a um baixo potencial hídrico externo que pode ser causado, por baixa umidade do solo ou problemas de excesso de sais no solo (Osmond *et al.*, 1980). Em geral, o  $K^+$  é acumulado em resposta à baixa umidade do solo, enquanto o  $Na^+$  é acumulado sob condições salinas (Glen *et al.*, 1996). Estudos têm evidenciado o papel do  $Na^+$  na osmorregulação em plantas sob condições de estresse salino, enquanto os solutos orgânicos são importantes em condições de déficit hídrico (Song *et al.*, 2006).

Neste trabalho a importância dos solutos inorgânicos para o ajustamento osmótico em condições de seca foi significativamente maior que a dos solutos orgânicos, quando se fez a contribuição relativa de cada um dos solutos para a osmolalidade total das folhas de *Atriplex nummularia* (Figura 24 e 25). Dentre os solutos inorgânicos analisados o  $Na^+$  e o  $Cl^-$  foram os

que tiveram um aumento significativo no percentual de contribuição, enquanto os demais tiveram um decréscimo significativo com a imposição dos ciclos sucessivos de seca/re-hidratação (Tabela 4). Isso corrobora o que já foi verificado na literatura, onde os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  podem contribuir enormemente para o ajustamento osmótico de células de folhas de plantas de *Atriplex nummularia* (Flowers *et al.*, 1977; Glenn & Brown, 1999; Ramos *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2006).

O percentual de contribuição dos solutos orgânicos analisados foi também diminuído com a imposição do tratamento de seca (Tabela 5). Dentre os solutos orgânicos analisados, GB foi o que mais contribuiu para o ajustamento osmótico, pois está confinada no citossol das células vegetais que compreende cerca de 10% do volume total da célula (Flowers *et al.*, 1977), assim a contribuição de GB para o AO do citossol pode ser 10 vezes maior. Neste caso, GB pode contribuir com a maioria do AO do citoplasma das células das folhas.

#### 4.5 – CONCLUSÕES

Os resultados evidenciam que o pré-condicionamento com NaCl influenciou positivamente no crescimento de *Atriplex nummularia*, em condições de seca, evidenciado pelo maior acúmulo de massa seca e melhor *status* hídrico das folhas. Dentre os solutos inorgânicos analisados, o Na<sup>+</sup> e o Cl<sup>-</sup> foram os que mais contribuíram para a osmorregulação das folhas em condições de deficiência hídrica. Enquanto, GB foi o soluto orgânico mostrou o maior percentual de contribuição para o potencial osmótico.

## **5. CAPÍTULO 3- “Efeito do Pré-Condicionamento de Plântulas de *Atriplex nummularia* com NaCl na Resposta a Seca Induzida por PEG”**

### **5.1 INTRODUÇÃO**

A resistência à seca é um fenômeno complexo que envolve a interação de inúmeros fatores fisiológicos da planta com o ambiente. Apesar dos anos de pesquisas sobre o estudo do déficit hídrico em plantas superiores, os processos moleculares que são mais rapidamente afetados, como também os mecanismos iniciais da resposta molecular, ainda não estão bem compreendidos (Bray, 1993). Atualmente sabe-se que os efeitos da seca na produção vegetal provocam alterações no metabolismo e no crescimento. Sua intensidade é diretamente dependente do estágio fisiológico em que o organismo se encontra e da sua severidade.

A escassez de água no solo ocasiona o decréscimo do potencial hídrico do solo, dificultando assim a absorção de água pelas plantas. As halófitas possuem características morfofisiológicas específicas que permitem realizar suas funções vitais mesmo condições de baixos potenciais osmóticos no ambiente radicular (Poljakoff-Mayber, 1975). Com isso, tem aumentado o interesse ao estudo de características fisiológicas de espécies xero-halófitas, visando identificar e entender os mecanismos que levam a resistência ao estresse hídrico (Wang & Showater, 2004).

Um dos mecanismos adaptativos que contribuem para a resistência das plantas ao estresse hídrico é o ajustamento osmótico envolve a acumulação de solutos orgânicos e inorgânicos nas células, visando o abaixamento do potencial hídrico da planta, em resposta à queda do potencial hídrico do solo, visando garantir assim a absorção de água pela planta (Zhang *et al.*, 1999). O ajustamento osmótico ocorre tanto em halófitas como em glicófitas, entretanto a forma como as plantas o realiza depende evidentemente, da espécie considerada e da rapidez com que o potencial hídrico do meio externo á raiz é reduzido (Prisco, 1980). Se a planta for

submetida a um choque osmótico (p.ex diminuição abrupta do potencial hídrico da solução de cultivo pela adição de polietileno glicol ou de NaCl), a fase inicial do ajustamento osmótico será a desidratação, resultando no abaixamento do potencial osmótico da célula. Em seguida, a célula poderá acumular solutos inorgânicos e orgânicos, promovendo o ajustamento osmótico. Se a redução do potencial hídrico externo ocorrer gradualmente, como acontece normalmente em condições de campo, a planta não deverá sofrer o processo de desidratação inicial e poderá manter sua homeostase osmótica através da absorção de sais e/ou pela síntese de solutos orgânicos (Prisco, 1980).

Tanto em condições de seca ou salinidade, o íon  $K^+$  e os compostos orgânicos são os solutos mais importantes para o ajustamento osmótico em células pouco vacuoladas, enquanto que os íons  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  são os principais solutos em células altamente vacuoladas (Wyn Jones & Gorham, 1983). Em algumas espécies do gênero *Atriplex*, o ajustamento osmótico é conseguido pela acumulação de osmoprotetores, principalmente glicina betaína, que tem um papel positivo na manutenção da integridade das membranas celulares sob condições de estresse hídrico (Wang & Showater, 2004).

Já foi verificado que os íons  $Na^+$  e  $Cl^-$  podem também contribuir para o ajustamento osmótico de células de folhas de plantas de *Atriplex nummularia* (Flowers *et al.*, 1977; Glenn & Brown, 1999; Ramos *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2006). Nos últimos anos, uma considerável atenção tem sido dada sobre o envolvimento direto ou indireto do  $Na^+$  no ajustamento osmótico de algumas espécies de halófitas sob condições de seca e salinidade (Osmond *et al.*, 1980; Khan *et al.*, 2000; Subbarao *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006). Foi verificado que o NaCl pode aliviar os efeitos provocados pelo estresse hídrico induzido por PEG em *Atriplex halimus*, porém o efeito do  $Na^+$  no ajustamento osmótico foi pequeno (Martinez *et al.*, 2005).

O polietileno glicol (PEG) é um agente osmótico comumente usado para induzir um estresse hídrico (Hanson & Nelsen, 1978). Basicamente, o PEG não penetra nos espaços da parede celular (Foster & Walters, 1991). Pensa-se geralmente que as moléculas do PEG com uma massa molecular maior que 3000 não são absorvidos por todos (Mexal *et al.*, 1975). Por isso, o PEG é tão utilizado em experimentos com espécies vegetais quando se deseja induzir um efeito osmótico, separando assim do efeito iônico, sendo ambos os efeitos, ocorridos em condições de estresse salino. Em condições de deficiência hídrica é verificado somente o efeito osmótico que impede a absorção de água pela planta.

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de um pré-condicionamento de plântulas de *Atriplex nummularia* ao NaCl, na resposta ao estresse hídrico induzido por PEG em condições controladas de sala de crescimento.

## **5.2 - MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **5.2.1 - Material vegetal**

Em toda fase experimental, foram utilizadas mudas de erva-sal (*Atriplex nummularia* Lindl.) que foram propagadas vegetativamente por estaquia, obtidas a partir de matrizes oriundas do campo. Neste experimento foram utilizadas plântulas com aproximadamente dois meses de idade cultivadas em vasos plásticos contendo substrato arenoso em condições de casa de vegetação.

### **5.2.2 - Local e condições do experimento**

As plântulas com idade de dois meses foram transferidas para sala de crescimento sob condições controladas de temperatura, umidade, fotoperíodo e intensidade luminosa nas dependências da casa de vegetação do Laboratório de Nutrição de Plantas e Estresse Ambiental – (LABPLANT) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza-CE cuja localização é de latitude 3° 44' sul e longitude 38° 33' W e clima local do tipo AW na classificação de Koeppen. Durante o experimento as plântulas ficaram expostas na sala de crescimento a temperaturas de 25±2 °C, controlada por sistema de ar refrigerado, umidade relativa do ar de 80%, mantida por dois umidificadores, aeração da solução nutritiva, mantida por bombas de ar (tipo aquário) e PAR de 240  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , utilizando-se um sistema de iluminação com lâmpadas fluorescentes osram-grolux de 20W misto com lâmpadas de vapor de mercúrio de 100W. Sendo todo o sistema controlado por *timer* automático que permita um controle sistemático de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. O período experimental foi compreendido entre os meses de Agosto e setembro de 2005.

### **4.2.3 Solução nutritiva**

Durante o experimento, foi utilizada a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada conforme a composição descrita na tabela 01 da pág.72

### **5.2.4 - Condução e tratamento das plantas**

As plântulas de *Atriplex nummularia*, com idade de dois meses foram transplantadas para cultivo hidropônico em vasos plásticos com capacidade para 0,8 L contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) diluída 1:4 cuja composição foi mostrada no item 5.2.3

em condições controladas de sala de crescimento como descrita no item 5.2.2. A solução nutritiva era trocada toda semana durante toda a fase experimental. As plântulas permaneceram por um período de uma semana na solução nutritiva para a aclimação das mesmas.

Após esse período de aclimação, as plântulas foram separadas em dois grupos onde foram aplicados dois pré-tratamentos: (1) um grupo de plantas permaneceu no cultivo com solução nutritiva (1:4) e o (2) outro grupo de plântulas, a solução nutritiva foi acrescida de 200mM de NaCl com respectiva C.E de 19,22 mS cm<sup>-1</sup>. Os dois grupos de plantas permaneceram sob esses dois pré-tratamentos por um período de duas semanas.

Após o período de pré-condicionamento, foram separados quatro subgrupos de plantas, onde foram adotados os seguintes tratamentos: (a) plantas que foram pré-condicionadas com solução nutritiva permaneceram nesse cultivo (**Controle**); (b) plantas que foram pré-condicionadas com solução nutritiva, foi adicionado polietileno glicol (PEG) na concentração 29,5% m/v (**PEG**); (c) plantas que foram pré-condicionadas com 200mM de NaCl permaneceram nesse cultivo (**NaCl**) e (d) plantas que foram pré-condicionadas com 200mM de NaCl, foi adicionado polietileno glicol na concentração de 29,5% m/v (**NaCl + PEG**). As concentrações de NaCl (200mM) e PEG (29,5% m/v) adotadas nesse experimento foram isosmóticas, correspondendo ambas um potencial osmótico de -1,0 MPa. Os quatro sub-grupos de plantas permanecerão nesses tratamentos por um período de uma semana.



**Figura 26** - Transferência de Plântulas de *Atriplex nummularia* com dois meses de idade para sala de crescimento sob condições controladas.



**Figura 27** - Plântulas de *Atriplex nummularia* pré-condicionadas com ou sem NaCl, submetidas a quatro tratamentos (Controle, PEG, NaCl, NaCl + PEG) em condições hidropônicas em sala de crescimento sob condições controladas por uma semana.

## **5.2.5 – Colheita das plantas e determinação analíticas**

Foi realizada uma única coleta após uma semana de tratamento, onde foram colhidas amostras de folhas, que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises bioquímicas posteriores. As plantas foram regularmente fotografadas com o objetivo de registrar os sintomas visuais do estresse e/ou quaisquer outras modificações morfológicas na parte aérea das plantas.

### **5.2.5.1 – Conteúdo relativo de água (CRA), Umidade e Suculência foliar**

Foram determinados como descrito no item 3.2.6.1 da pág. 73

### **5.2.5.2 - Integridade das membranas (vazamento de eletrólitos)**

Foi determinado como descrito no item 3.2.6.2 da pág. 73

### **5.2.5.3 – Determinação da concentração de sódio e potássio**

Foram determinadas como descrito no item 3.2.6.4 da pág. 74

### **5.2.5.4 – Determinação da concentração de cloreto**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.5 da pág. 74

### **5.2.5.5 - Determinação do teor de nitrato**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.7 da pág. 75

### **5.2.5.6 – Determinação da concentração de açúcares solúveis totais**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.9 da pág. 76

### **5.2.5.7 - Determinação de aminoácidos livres totais (N- $\alpha$ -amino livre)**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.10 da pág.77

#### **5.2.5.8 - Concentração de proteínas solúveis**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.11 da pág. 77

#### **5.2.5.9 - Determinação do teor de prolina livre**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.12 da pág. 78

#### **5.2.5.10 – Determinação de glicina betaína**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.13 da pág. 78

#### **5.2.5.11 - Osmolalidade total, potencial osmótico e ajustamento osmótico**

Foram determinados como descrito no item 3.2.6.14 da pág.79

#### **5.2.5.12 - Contribuição relativa de solutos inorgânicos e orgânicos para o potencial osmótico das folhas**

Foi determinada como descrito no item 3.2.6.15 da pág. 79

#### **5.2.6 - Delineamento experimental e análises dos resultados**

Os tratamentos foram distribuídos de acordo com um delineamento inteiramente casualizado, obedecendo a um esquema (4 x 4), correspondendo respectivamente a quatro tratamentos ( **Controle**; **PEG**; **NaCl**; **NaCl + PEG**) e quatro repetições, sendo cada parcela experimental representada por um recipiente contendo uma planta, perfazendo um total de 16 parcelas experimentais. Os resultados foram analisados estatisticamente com base na análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey,  $p < 0,05$ ).

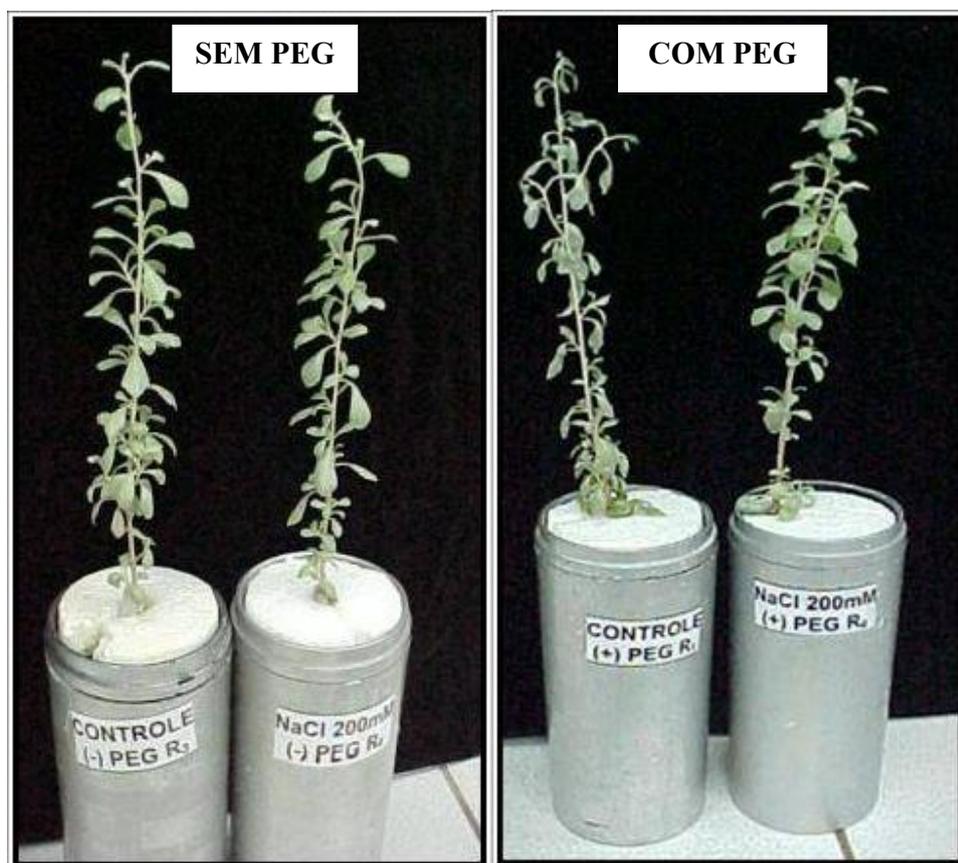
### 5.3 RESULTADOS

Após uma semana de tratamento, ambos os grupos de plântulas de *Atriplex nummularia* tratadas com PEG, tanto as pré-condicionadas somente com solução nutritiva quanto as pré-condicionadas com a adição de 200mM de NaCl na solução nutritiva, sofrerão um choque hiper-osmótico como evidenciado pelos sintomas típicos de murchamento das folhas (**Figura 26 e 28**).

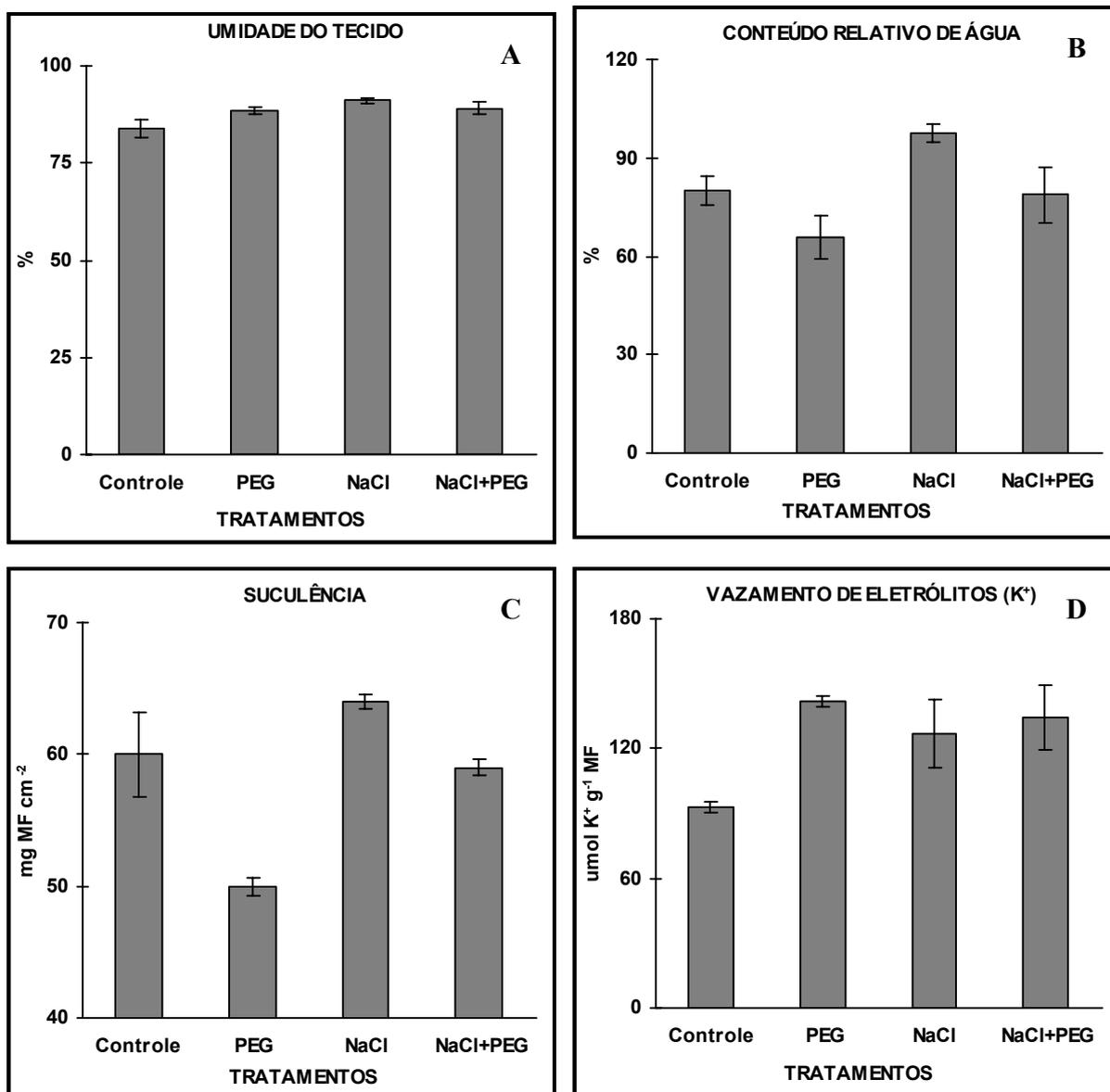
Essa perda de turgor das folhas apresentado por ambos os grupos de plântulas foi evidenciado pela diminuição do conteúdo relativo de água (CRA) das folhas (**Figura 29A**). No grupo de plântulas tratadas somente com NaCl, foi verificado um aumento de cerca de 20% no CRA, quando se compara com o grupo de plantas controle (**Figura 29A**). Entretanto, foi visto que a umidade das folhas das plântulas de *Atriplex nummularia* não sofreu variação em todos os tratamentos adotados, permanecendo aproximadamente 88% (**Figura 29B**).

Foi observado um decréscimo significativo na suculência foliar de ambos os grupos de plantas tratadas com PEG, sendo maior nas plantas que foram pré-condicionadas somente com solução nutritiva (**Figura 29C**). A suculência das folhas do grupo de plântulas tratadas com NaCl foi maior quando comparada com o grupo controle (**Figura 29C**).

O vazamento de eletrólitos expresso pela extrusão de  $K^+$  foi significavelmente aumentado nas plantas tratadas com PEG que foram pré-condicionadas somente com solução nutritiva (**Figura 29D**). Entretanto as que foram pré-condicionadas com NaCl, o vazamento de eletrólitos permaneceu inalterado (**Figura 29D**).



**Figura 28** - Sintomatologia das plântulas de *Atriplex nummularia* pré-condicionadas com solução nutritiva e 200mM de NaCl, respectivamente, que foram tratadas posteriormente com ou sem PEG 29,5% m/v.



**Figura 29** – Variação no conteúdo relativo de água (A), na umidade (B), na suculência (C) e no vazamento de eletrólitos (D) das folhas de plântulas de *Atriplex nummularia* submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.

O pré-condicionamento das plântulas de *Atriplex nummularia* com solução nutritiva acrescida com 200mM de NaCl provocou um aumento de aproximadamente três vezes as concentrações de sódio e cloreto nas folhas, quando comparadas com as que foram pré-condicionadas somente com solução nutritiva, onde não sofreu qualquer alteração (**Figura 30A e 30B**). Interessantemente, o tratamento com PEG nas plântulas que foram pré-condicionadas com NaCl, provocou a diminuição de aproximadamente 18% do conteúdo de sódio e cloreto nas folhas (**Figura 30A e 30B**).

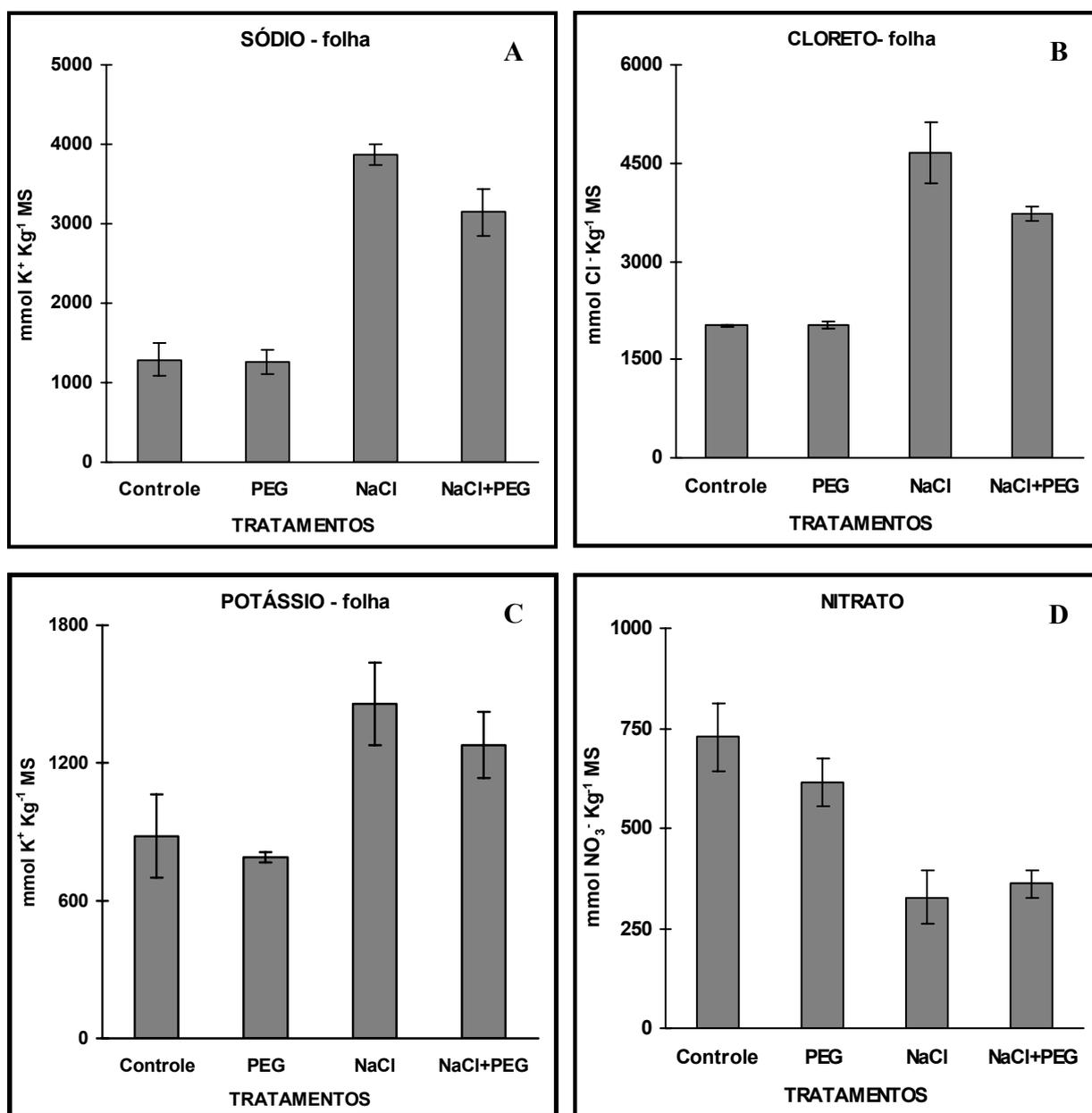
O conteúdo de potássio das folhas foi enormemente maior nas plântulas pré-condicionadas com NaCl (**Figura 30C**), porém o tratamento com PEG não influenciou nesse conteúdo em ambas as plântulas pré-tratadas (**Figura 30C**).

O conteúdo de nitrato nas folhas foi significavelmente menor nas plântulas pré-condicionadas com NaCl, sendo essa diferença cerca de 50% o conteúdo encontrado nas folhas das plântulas pré-condicionadas somente com solução nutritiva (**Figura 30D**). Não houve influência do tratamento com PEG em ambos os grupos de plântulas pré-condicionadas (**Figura 30D**).

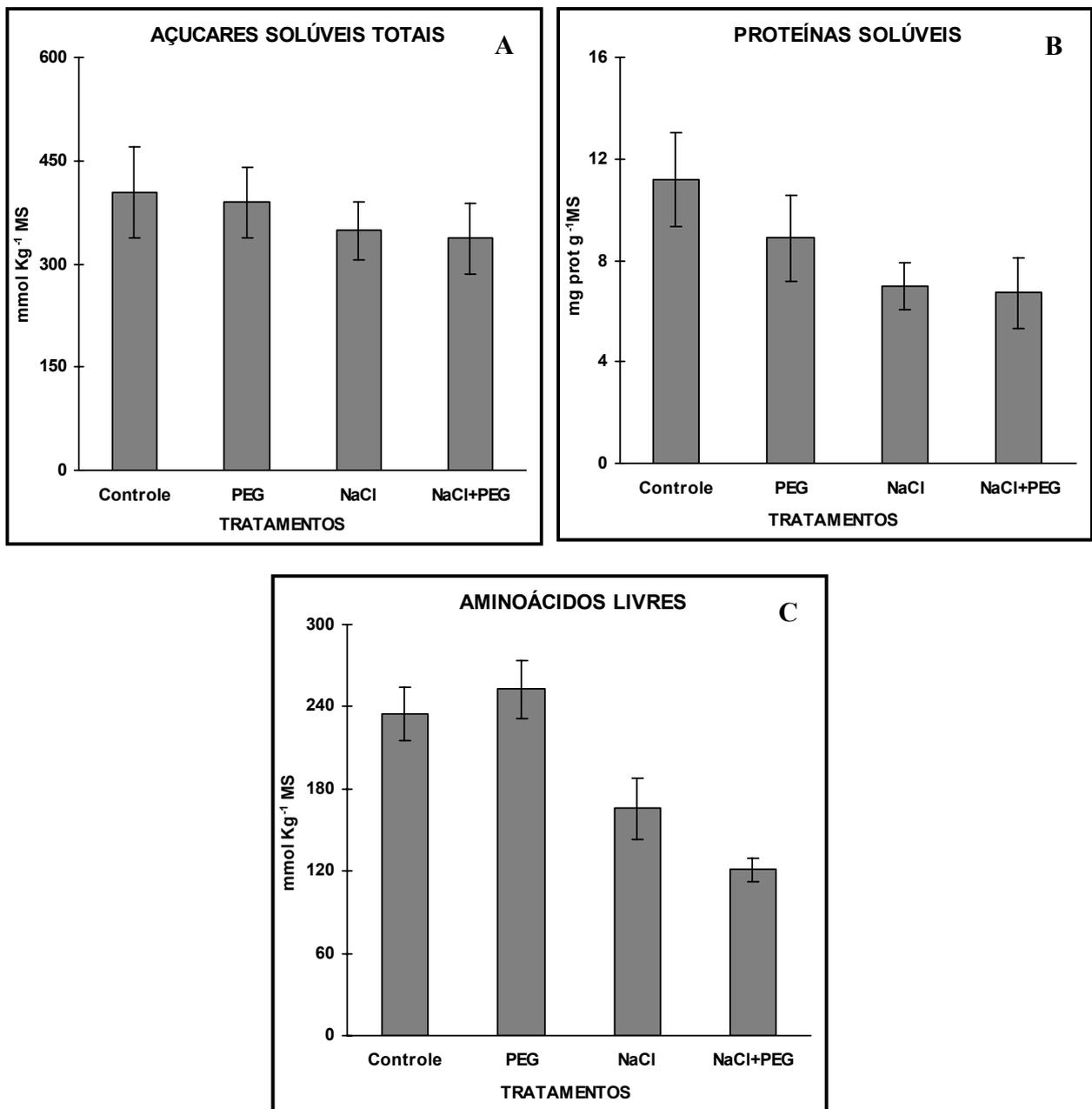
Não houve diferença significativa no conteúdo de açúcares solúveis totais em todos os tratamentos analisados (**Figura 31A**). Houve um decréscimo significativo no conteúdo de proteínas solúveis das folhas em todos os tratamentos, quando comparado com o grupo de plantas controle, sendo esse decréscimo maior nas plântulas tratadas com NaCl (**Figura 31B**). A queda no conteúdo de proteínas solúveis das folhas observado em maior intensidade no tratamento salino foi acompanhada por um decréscimo significativo no conteúdo de aminoácidos livres das folhas de aproximadamente 30% quando comparado com as que não foram pré-condicionadas com NaCl. (**Figura 31C**). A queda no conteúdo de aminoácidos livres ainda foi mais intensa quando as plântulas pré-tratadas com sal foram submetidas ao choque hiper-osmótico com PEG (**Figura 31C**). Entretanto, o tratamento com PEG não modificou o conteúdo de aminoácidos livres nas plântulas não pré-tratadas com NaCl (**Figura 31C**).

O tratamento com PEG provocou um aumento significativo no conteúdo de prolina somente nas plântulas pré-condicionadas na ausência de NaCl (**Figura 30A**). Interessantemente, o conteúdo de prolina nas plântulas pré-condicionadas com NaCl foi significavelmente menor (**Figura 30A**).

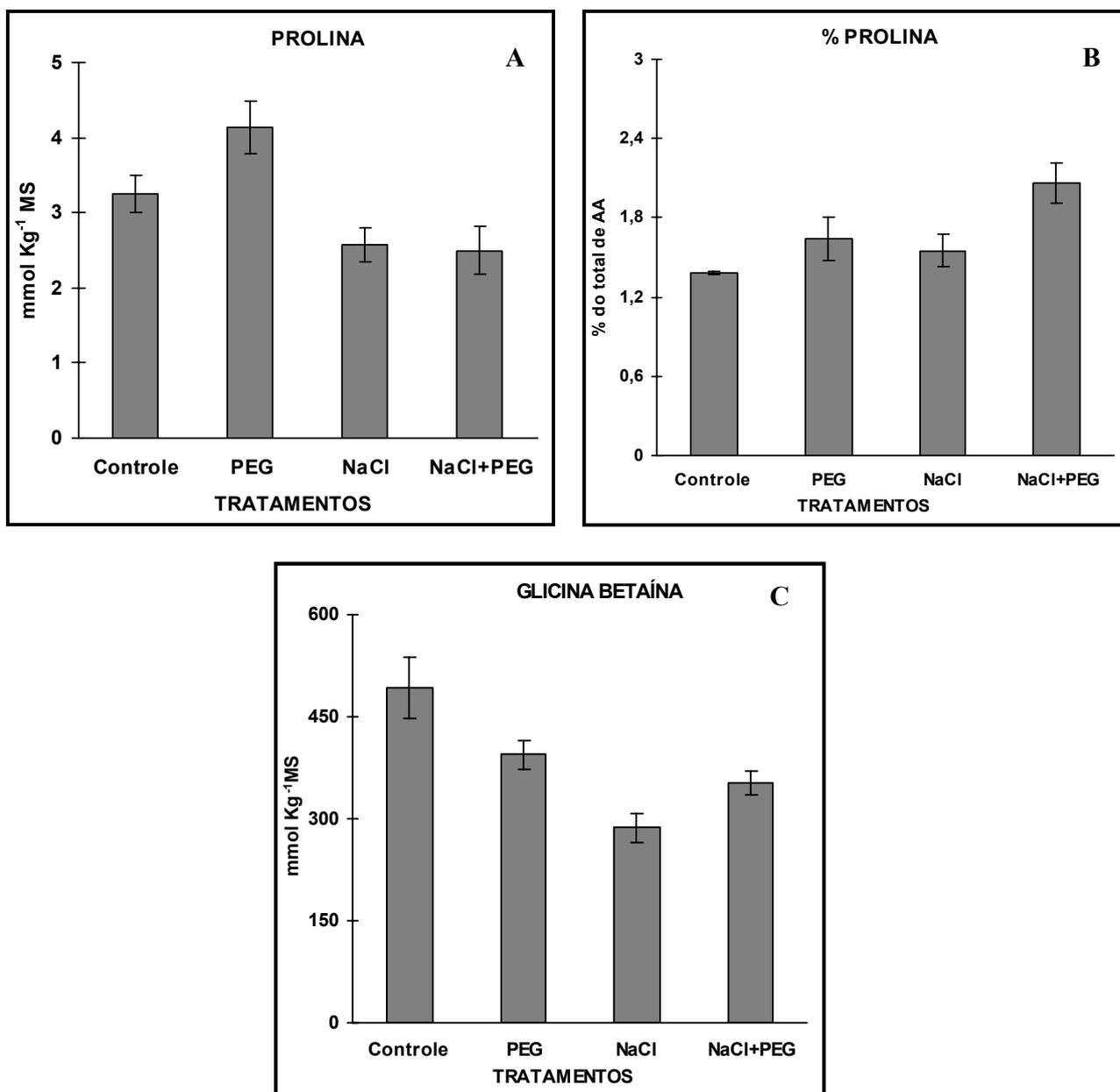
O percentual de prolina em relação ao *pool* de aminoácidos livres observado em todos os tratamentos foi extremamente baixo, chegando a no máximo 2% no tratamento NaCl + PEG (**Figura 32B**). O conteúdo de glicina betaína foi significavelmente diminuído em todos os tratamentos, quando comparado com o grupo de plantas controle (**Figura 32C**), sendo o decréscimo mais acentuado no grupo tratado somente com NaCl (**Figura 32C**).



**Figura 30** - Variação no conteúdo de sódio (A), cloreto (B), potássio (C) e nitrato (D) das folhas de plântulas de *Atriplex nummularia* submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.



**Figura 31** - Variação na concentração de açúcares solúveis (A), proteínas solúveis (B) e aminoácidos livres (C) das folhas de de plântulas de *Atriplex nummularia* submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.



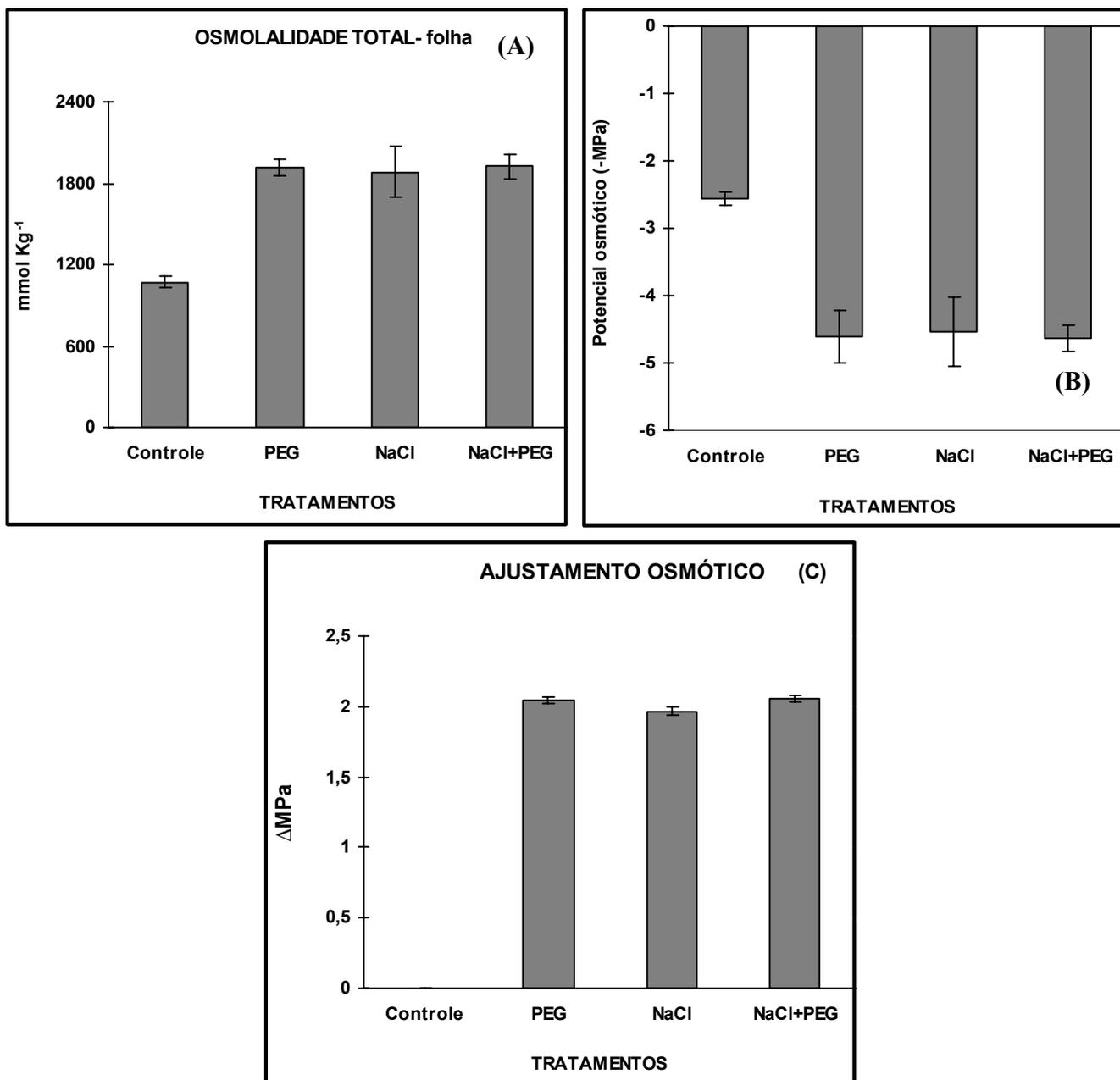
**Figura 32** - Variação na concentração de prolina (A), no percentual de prolina do *pool* de aminoácidos livres (B) e na concentração de glicina betaína (C) das folhas de plântulas de *Atriplex nummularia* submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.

As folhas das plântulas de *Atriplex nummularia* sofreram um aumento significativo na osmolalidade total em todos os tratamentos analisados, quando comparando com o grupo de plantas controle (**Figura 33A**). Porém, não houve diferença estatística na osmolalidade entre esses tratamentos de PEG, NaCl e NaCl + PEG (**Figura 33A**).

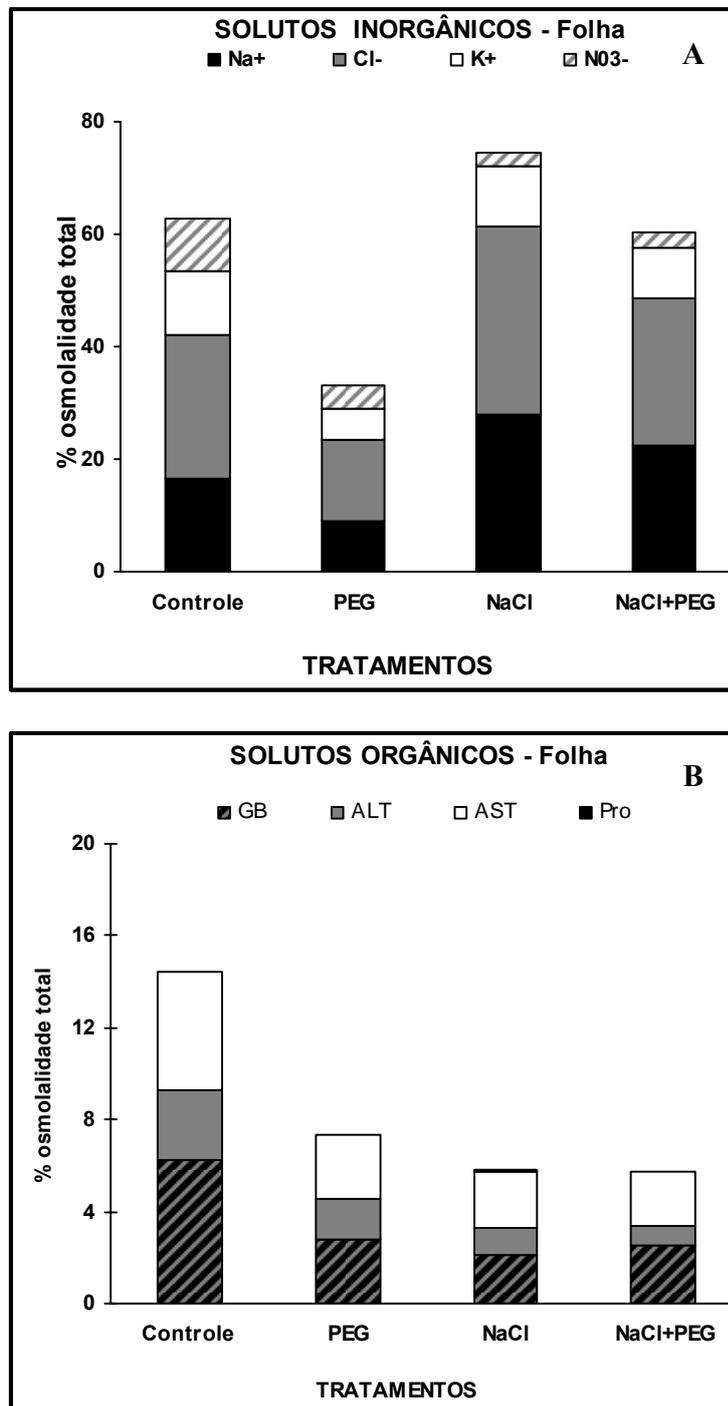
Esse aumento na osmolalidade total verificado nas folhas de *Atriplex nummularia*, foi acompanhado por um decréscimo acentuado no potencial osmótico em todos os tratamentos comparando com o grupo controle (**Figura 33B**). Da mesma forma, esse decréscimo no potencial osmótico das folhas não teve diferença significativa entre os tratamentos utilizados (**Figura 33B**). Os tratamentos provocaram um rebaixamento de cerca de duas vezes o potencial osmótico observado no controle, levando a promover um ajustamento osmótico (OA) das folhas das plântulas tratadas com PEG, NaCl e NaCl + PEG igual a 2,0 (**Figura 33C**).

Quando se estimou a contribuição relativa dos solutos inorgânicos para a redução no potencial osmótico em todos os tratamentos analisados através do percentual de cada soluto inorgânico na osmolalidade total das folhas, verificou-se que o tratamento com PEG diminuiu a participação relativa de todos os solutos inorgânicos analisados (**Figura 34A**) quando comparando com os demais tratamentos. Entretanto, o tratamento com NaCl provocou um aumento na contribuição relativa de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  nas folhas, quando comparado com o tratamento somente com PEG, não diferindo estatisticamente do tratamento NaCl + PEG (**Tabela 6**). O percentual de contribuição do  $\text{NO}_3^-$  para o ajustamento osmótico das folhas foi significavelmente decrescida com a aplicação dos tratamentos quando se compara o controle (**Tabela 6**). Os íons salinos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  foram os que mais contribuíram para as mudanças observadas no potencial osmótico de *Atriplex nummularia* durante a aplicação dos tratamentos (**Tabela 6**).

Quando se estimou a contribuição relativa dos solutos orgânicos para a redução no potencial osmótico em todos os tratamentos analisados, verificou-se que os tratamentos com PEG, NaCl e NaCl + PEG provocaram uma redução na participação relativa de todos os solutos orgânicos analisados quando comparando com o controle (**Tabela 7**). Dos solutos orgânicos analisados a glicina betaína mostrou uma maior percentual de contribuição para o ajustamento osmótico de folhas de *Atriplex nummularia* durante a aplicação desses tratamentos (**Tabela 7**). A contribuição de prolina para o ajustamento osmótico foi insignificante, menos de 0,1 % (**Tabela 7**).



**Figura 33** - Variação na osmolalidade total (A), no potencial osmótico (B) e no ajustamento osmótico das folhas de plântulas de *Atriplex nummularia* submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.



**Figura 34** – Contribuição relativa de Solutos inorgânicos (A) e orgânicos (B) no potencial osmótico das folhas de plântulas de *Atriplex nummularia* submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana. Os valores representam médias de quatro repetições.

**Tabela 6** - Contribuição relativa de solutos inorgânicos na osmolalidade total das folhas de *Atriplex nummularia* submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana.. Os valores representam médias de quatro repetições.

Tratamentos	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
[NaCl] mM	%			
Controle	16,44	25,71	11,22	9,29
PEG	8,92	14,40	5,60	4,35
NaCl	27,92	33,59	10,51	2,35
NaCl + PEG	22,30	26,34	9,04	2,55

**Tabela 7** - Contribuição relativa de solutos orgânicos na osmolalidade total das folhas de *Atriplex nummularia* submetidas a quatro diferentes tratamentos (Controle; PEG; NaCl; NaCl + PEG) por um período de uma semana.. Os valores representam médias de quatro repetições.

Tratamentos	glicina betaína	Aminoácidos livres	Açúcares solúveis	prolina
[NaCl] mM	%			
Controle	6,28	5,13	2,99	0,041
PEG	2,79	2,76	1,79	0,029
NaCl	2,07	2,51	1,20	0,018
NaCl + PEG	2,49	2,68	0,85	0,017

## 5.4 DISCUSSÃO

O polietileno glicol (PEG) é um agente osmótico comumente usado em experimentos com vegetais para induzir um estresse hídrico (Hanson & Nelsen, 1978). Foi verificado que o NaCl pode aliviar os efeitos provocados pelo estresse hídrico induzido por PEG em *Atriplex halimus*, porém o efeito do Na<sup>+</sup> no ajustamento osmótico foi pequeno e indireto (Martinez *et al.*, 2005). Neste estudo, o pré-tratamento das plântulas de *Atriplex nummularia* com NaCl, não minimizou os efeitos do estresse hídrico induzidos pelo PEG, em relação ao *status* hídrico das folhas, como pode ser evidenciado pelo decréscimo significativo no CRA, na suculência e no aumento do vazamento de eletrólitos (Figura 27). Esse efeito do PEG no *status* hídrico da planta, também pôde ser evidenciado pelo murchamento das folhas (Figura 26), mostrando assim o efeito do choque osmótico provocado pela imersão das raízes em solução contendo esse agente osmótico.

O CRA das folhas foi significativamente decrescido com o PEG. Interessantemente, as folhas das plantas tratadas somente com NaCl mostraram um maior CRA, porém o mesmo foi também decrescido com o tratamento de 29,5% PEG. Esses resultados foram similares aos encontrados por Martinez *et al.*, 2005, em *Atriplex halimus*, trabalhando com folhas jovens e velhas na ausência e na presença de 15% PEG e 50mM de NaCl. O aumento na suculência foliar é uma típica adaptação morfológica ao estresse osmótico provocado pela salinidade (Popp, 1995). Neste trabalho, as plântulas que foram tratadas apenas com 200mM de NaCl na ausência de 29,5% PEG mostraram um aumento na suculência das folhas, porém o tratamento com 29,5% PEG provocou um decréscimo nessas suculência tanto nas plântulas pré-condicionadas ou não com sal. Mostrando assim, que o efeito osmótico provocado pelo PEG foi mais determinante na suculência das folhas e que o pré-condicionamento das plântulas com NaCl, não foi capaz de atenuar esses efeitos.

O PEG não foi capaz de induzir alterações no conteúdo de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup> das folhas, pois as concentrações foram as mesmas observadas nas plântulas controle, que foram cultivadas na ausência de PEG e NaCl. O pré-condicionamento com NaCl provocou um aumento no conteúdo de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nas folhas, apesar de ter provocado uma pequena redução nesses conteúdos com o tratamento de PEG. Mostrando que o pré-condicionamento com NaCl foi capaz de reduzir os conteúdos de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> das folhas em condições de estresse osmótico provocado pelo PEG.

Em *Atriplex halimus*, a interação de 50mM de NaCl e 15% PEG aumentaram o conteúdo de Na<sup>+</sup> das folhas (Martinez *et al.*, 2005). Em outras espécies de halófitas, a alta seletividade para absorção de K<sup>+</sup> pelos canais de K<sup>+</sup>, é um componente chave para a resistência a salinidade, bem como a eficiência na barreira endodérmica para o movimento de Na<sup>+</sup> através do apoplasto (Peng *et al.*, 2004). Isso não parece ser validado pela *Atriplex nummularia* neste estudo que mostrou como uma típica incluidora de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nas plântulas que forma tratadas apenas com NaCl.

O tratamento das plântulas com PEG na ausência de NaCl, não provocou mudanças no conteúdo de K<sup>+</sup>. Demonstrando assim, que este nutriente possa ter sido utilizado para manutenção do turgor dessas plantas nessas condições de deficiência hídrica. O K<sup>+</sup> é um componente essencial para o ajustamento osmótico celular e principalmente para o fenômeno de abertura e fechamento estomático (Maathuis & Amtmann, 1999). Interessantemente, o conteúdo de K<sup>+</sup> das folhas das plantas que foram pré-condicionadas com NaCl foi significativamente aumentado tanto na ausência ou presença de PEG. Isso não está de acordo com a literatura, onde a salinidade provoca o decréscimo significativo do conteúdo de K<sup>+</sup> das folhas de várias espécies de *Atriplex* (Bajji *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 2000; Serrano & Rodriguez-Navarro, 2001; Araújo, 2003; Araújo *et al.*, 2006).

O tratamento com PEG *per se* não provocou mudanças no conteúdo de nitrato das folhas, porém o NaCl induziu um decréscimo significativo nesse conteúdo. Mostrando que o sal tem um efeito mais deletério no conteúdo de nitrato do que a seca, talvez pelo efeito iônico e não osmótico. Tem sido sugerido que o tratamento com NaCl provoca o decréscimo significativo da concentração de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> das folhas de não halófitas (Gouia *et al.*, 1994; Botella *et al.*, 1997) e isto pode ser devido ao antagonismo entre NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e o Cl<sup>-</sup> (Bottacin *et al.*, 1985) ou a interferência do NaCl externo com um ou mais tipos de transportadores na membrana plasmática de células da raiz (Stientra, 1986).

O pré-condicionamento das plântulas de *Atriplex nummularia* com NaCl, provocou uma redução significativa no conteúdos de todos os solutos orgânicos analisados nas folhas (glicina betaína, aminoácidos livres, proteínas solúveis e prolina) com exceção dos açúcares solúveis. O conteúdo de açúcares solúveis das folhas não foi alterado em nenhum dos tratamentos. Ao contrário, em folhas de *Atriplex halimus*, o tratamento com PEG provocou aumento no conteúdo de carboidratos solúveis (Martinez *et al.*, 2005). Esse decréscimo no conteúdo de aminoácidos livres e proteínas solúveis não foram visto quando as plântulas foram

tratadas somente com PEG na ausência de NaCl. Mostrando assim, que esses compostos nitrogenados foram mais sensíveis ao NaCl que ao PEG, talvez por causa do efeito iônico provocado pelo sal.

A seca induzida pelo PEG provocou um aumento no conteúdo de prolina na folhas das plântulas não pré-condicionadas com NaCl, porém o pré-condicionamento com NaCl induziu uma redução nesse. A síntese de prolina e sua degradação têm sido mostradas ser altamente correlacionada com o ambiente osmótico (Rhodes & Handor, 1989) e a habilidade de sua acumulação tem sido usada como base para seleção à tolerância á seca em várias espécies (Stajner *et al.*, 1995; Van Heeden & De Villiers, 1996).

Estudos evidenciam que a prolina tem um importante papel na tolerância à seca de xero-halófitas (Wang *et al.*, 2004). Diversos trabalhos têm relacionado à acumulação de prolina com as injúrias provocadas pelo efeito iônico e osmótico do estresse salino (Delauney & Verma, 1993; Lutts *et al.*, 1996; Lutts *et al.*, 1999; Hare *et al.*, 1999; Viégas & Silveira, 1999; Silveira *et al.*, 2003; Rocha, 2003; Ashraf & Harris, 2004). Entretanto, neste estudo o efeito osmótico provocado pelo PEG foi mais eficiente em induzir o acúmulo de prolina nas folhas. Apesar de alguns estudos evidenciarem o acúmulo de GB em condições de salinidade e seca (Rhodes & Hanson, 1993; Subbarao *et al.*, 2001; Di martino *et al.*, 2003). Neste estudo, não houve relação entre relação entre o tratamento de PEG e NaCl e a acumulação de GB, pois o conteúdo da mesma foi significavelmente decrescido com a imposição desses tratamentos.

Houve um aumento significativo da osmolalidade total acompanhado pelo decréscimo no potencial hídrico das folhas em todos os tratamentos, quando comparados com o controle. Não houve diferença entre as plântulas pré-condicionadas ou não com NaCl. Mostrando assim que o pré-condicionamento com NaCl, não influenciou num melhor ajustamento osmótico das folhas, pois o mesmo não teve diferença significativa. A porcentagem de contribuição relativa dos solutos inorgânicos para o potencial osmótico foi significavelmente maior que a dos solutos orgânicos em todos os tratamentos analisados. O tratamento com PEG induziu uma redução na contribuição relativa de todos os solutos inorgânicos e orgânicos analisados.

Da mesma forma que resultados anteriores o Na<sup>+</sup> e o Cl<sup>-</sup> contribuíram em maior porcentagem para o potencial osmótico das plântulas de *Atriplex nummularia* na ausência ou na presença de PEG e NaCl. Isso demonstra mais uma vez a importância desses íons salinos para a osmorregulação dessas espécies de halófitas em condições de seca e salinidade.

## **5.5 CONCLUSÕES**

O pré-condicionamento das plântulas de *Atriplex nummularia* com NaCl não foram capazes de atenuar os efeitos induzidos pelo PEG.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amzallag, G. N.; Lerner, H. R.; Poljakoff-Mayber, A. Induction of increased salt tolerance in *Sorghum bicolor* by NaCl pretreatment. *Journal of Experimental Botany*, v.41(222), p. 29-34, 1990.

Angelocci, L.R. Absorção e transporte de água nas plantas superiores. Edições departamento de física e meteorologia, ESALQ-USP, 51p, 1995.

Aoki, N.; Ohnishi, J.; Kanai, R. Two different mechanisms for transport of pyruvate in to mesophyll chloroplasts of C<sub>4</sub> plants- a comparative study. *Plant Cell Physiol*, v.33, p.805-809, 1992.

Araújo, S.A.M. Respostas fisiológicas de *Atriplex nummularia* L. sob diferentes níveis de salinidade. Monografia de graduação, UFC, 54p, 2003.

Araújo, S.A.M.; Silveira, J.A.G.; Almeida, T.D.; Rocha, I.M.A.; Morais, D.L.; Viégas, R.A. Salinity resistance in the halophyte *Atriplex nummularia* Lind. Grown under increasing NaCl levels. *Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental*, v.10, n.1, 2006 (*In press*).

Ashby, W.C.; Beadle, N.C.W. Salinity factors in the growth of Australian saltbushes. *Ecology*, v.38, p.344-352, 1957.

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

Aslam, Z.; Jeschke, W.D.; Barrett-Lennard, E.G.; Setter, T.L.; Watkin, E.; Greenway, H. Effects of external NaCl on the growth of *Atriplex amnicola* and the ion relations and carbohydrate status of leaves. *Plant, Cell and Environment*, v.9, p.571-580, 1986.

Ayers, R.S.; Westcot, D.W. A qualidade da água na agricultura. Campina Grande: UFPB, 1991. 218p.

Ayoub, A.; Khalil, M.; Grace, J. Acclimation to drought in *Acer pseudoplatanus* L. (sycamore) seedlings. *Journal of Experimental Botany*, v.43, p.1591-1602, 1992.

Azevedo Neto, A.D.; Prisco, J.T.; Enéas Filho, J.; Lacerda, C.F.; Silva, J.V.; Costa, P.H.A.; Gomes Filho, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Brazilian Journal of Plant physiology*, v.16, p.31-38, 2004.

Babu, R.C.; Pathan, M.S.; Blum, A.; Nguyen, H.T. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop. Science*, v.39, p.150-158, 1999.

Bajji, M.; Kinet, J.M.; Lutts, S. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science*, v.137, p. 131-142, 1998.

Bajji M.; Lutts, S.; Kinet, J.M. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Science*, v.160, p.669-681, 2001.

Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 39, p.205-209, 1973.

Blum A. Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Science*, v.29, p.230–233, 1989.

Boegli, W.J.; Thullen, J.S. Eastern municipal water district treatment/saline vegetated wetlands pilot study. *Water Treatment Technology, Program Report*, v.16: final report. 116p. II. 1996.

Bohnert, H.J.; Nelsen, D.E.; Jensen, R.G. Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell*, v.7, p.1099–1111, 1995.

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

Bor, M.; Ozdemir, F.; Turkan, I. The effects of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, v.164, p.77-84, 2003.

Borsani, O., V. Vlapuesta, and M.A. Botella. 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: A molecular biology approach. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73:101–115.

Botaccin, A.; Cacco, G.; Saccoman, M. Nitrogen absorption and assimilation in NaCl-resistant and NaCl-susceptible millet genotypes (*Pennisetum americanum*), *Can.J.Bot.* v.63, p.517-520, 1985.

Botella, M.A.; Martinez, V.; Nieves, M.; Cerda, A. Effect of salinity on the growth and nitrogen uptake by wheat seedlings. *Journal of Plant Nutr.*,v.20, p.793-804, 1997.

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

Bowyer J. R.; Leegood R. C. Photosynthesis. In: Dey, P.M.; J. B. Harbone; J. E Bonner (Eds.). *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, p.49-110. 1997.

Bradley, P.H.; Morris, J.T. Relative importance of ion exclusion, secretion and accumulation in *Spartina alterniflora* Loisel. *Journal and Experimental Botany*, v. 42, p.1525–1532, 1991.

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

Bray, E.A. Molecular responses to water-deficit. *Plant Physiology: update on water deficit*, v.103, p.1035-1040, 1993.

Bray, E.A.; Bailey-Serres, J.; Weretilnyk, E. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (eds). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: ASPP, 2000.p. 1158-1203.

Briens, M.; Larher, F. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant Cell Environ.*, v.5, p.287-292, 1982.

Brilhante, J.C.A. Respostas fisiológicas e acumulação de prolina em duas progênes de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) sob estresse salino. Fortaleza: UFC, 2003. 52p. Monografia de graduação.

Brownell, P.F.; Sodium as an essential micronutrient element for a higher plant (*Atriplex vesicaria*). *Plant Physiology*, v.40, p.460-468. 1965.

Brownell, P.F.; Bielig, L.M. The role of sodium in the conversion of pyruvate to phosphoenolpyruvate in the mesophyll chloroplasts of C<sub>4</sub> plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.23, p. 171-177. 1996.

Bukovinszky, L.; Frota, D.Q.; Souza, W. Métodos de cadastramento da infra-estrutura de uso comum e levantamento das exigências de recuperação de drenos e áreas salinizadas nos perímetros irrigados. Fortaleza, convênio DNOCS/AGROINVEST, 35p. (mimeógrafo).

Burnet, M.; Lafontaine, P.; Hanson, A.D. Assay , purification and partial characterization of choline monoxygenase from spinach. *Plant Physiology*, v.108, p.581-588, 1995.

Büsis, D.; Heineke, D. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit II. Contents and subcelular distribution of organic solutes. *Journal of Environmental Botany*, v.49, p.1361-1370, 1998.

Campbell, E.G.; Matthewson, W.J. Optimizing germination in *Atriplex nummularia* for commercial cultivation. *South African Journal Botany*, v.58, n.6, p.478-481, 1992.

Carvajal, M.; Cerdá, A.; Martínez, V. Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity?. *New Phytologist*, v.145, n.3, p.439-447, 2000.

Cataldo, D. A.; Haroon, M.; Schrader, L. E.; Yougs, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Soil Science and Plant Analyses*, v.6(1), p. 71-80. 1975.

Cavaliere, A.J. Proline and glycinebetaine accumulation by *Spartina alterniflora* in response to NaCl and nitrogen in a controlled environment. *Oecologia*, v.57, p.20-24, 1983.

Chatterton, N.J.; MCKell, C.M. *Atriplex polycarpa*. I. Germination and growth as affected by sodium chloride in water cultures. *Agronomy Journal*, v.61, p. 451-453. 1969.

Chimenti, C.A.; Pearson, J.; Hall, A.J. Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crop Res*, v.10, p.235-46, 2002.

Cosgrove, D.J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v.50, p.391-417, 1999.

Cuartero, J.; Fernández-Muñoz, R. 1999. Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, v.78, p. 83-125, 1999.

Dantas, J.P.; Marinho, F.J.L.; Ferreira, M.M.M.; Amorim, M. do S.N.; Andrade, S.I. de O.; Sales, A.L. Avaliação de genótipos de feijão-de-corda sob salinidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.6, n.3, p.425-430, 2002.

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

Di Martino, C.; Delfine, S.; Pizzuto, R.; Loreto, F.; Fuggi, A. 2003. Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. *New Phytologist*, v.158, p.455–463, 2003.

Drennan, P.; Pammenter, N.W. Physiology of salt secretion in the mangrove *Avicennia marina* (Forssk), *New Phyt.*, v.91, p.597-606, 1982.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

Erdei, L.; Taleisnik, E. Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. *Physiologia Plantarum*, v.89, p.381-387, 1993.

FAO (Roma, Itália). Estudos de caso de espécies vegetales para zonas áridas y semiáridas. Santiago: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 143p, 1996.

FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils.2000. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>. Acesso em: 10 março 2006.

Fernandes, V.L.B. Recomendações de adubação e calagem para o estado do Ceará. Fortaleza, UFC, 1993, 248p.

Feng, Y.; Li, X.; Boersma, L. Roles of osmotic adjustment and turgor potential in leaf area expansion. *Physiology Plant*, v.90, p.1-8, 1994.

Ferreira, P. A., Qualidade de água e manejo água-planta em solos salinos. Brasília, DF: ABEAS, Viçosa, MG: UFV, Departamento de Engenharia Agrícola,141 p. (ABEAS. Curso de engenharia e manejo de irrigação. Módulo, 10), 1996.

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.

Flowers, T.J.; Yeo, A.R. Effect of salinity on plant growth and crop yields, in: J.H. Cherry (Ed.), *Environmental Stress in Plants*, Springer-Verlag, New York, p.99–119, 1987.

Flowers, T.J.; Hajibagheri, M.A.; Yeo, A.R. Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oerthi hypothesis. *Plant Cell Environ.*, v.14, p.319-325, 1991.

Flowers, T.J.; Garcia, A.; Koyama, M.; Yeo, A.R. Breeding for salt tolerance in crop plants – the role of molecular biology. *Acta physiology Plantarum*, v.19, p.427-433, 1997.

Foster, S.A.; Walters, D.R. Polyamine concentrations and arginine decarboxylase activity in wheat exposed to osmotic stress. *Plant physiology*, v.82, p.185-190, 1991.

Furtado, F.N. Aproveitamento de rejeitos de dessalinizadores de água na irrigação de *Atriplex nummularia* Lindl (erva sal). Dissertação de mestrado, UFC, Fortaleza, CE, 2002.

Gale, J.; Poljakoff-Mayber, A. Interrelations between growth and photosynthesis of salt bush (*Atriplex halimus* L.) grown in saline media. *Aust. J. Bio, sci*, v.23, p.937-945, 1970.

Girija, C.; Smith, B.N.; Swamy, P.M. Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Environmental Experimental Botany*, v.47, p.1–10, 2002.

Gibon, Y.; Bessieres, M.A.; Larher, F. Is glycinebetaine a noncompatible solute in higher plants that do not accumulate it? *Plant Cell Environ*, v.20, p.329–40, 1997.

Gilbert, G.A.; Gadush, M.V.; Wilson, C.; Madore, M.A. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. During salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, v.49, p.107-114, 1998.

Gheyi, H. R. Problemas de salinidade na agricultura irrigada. In: Oliveira, T.; Assis JR, R.N.; Romero, R.E.; Silva, J.R.C.(eds.) Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. cap.16, p.329-345.

Glenn, E.P.; Brown, J.J. Effects of soil salt levels on the growth and water use efficiency of *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae) varieties in drying soil. American Journal of Botany, v.85, p.10–16, 1998.

Glenn, E.; Hicks, N.; Riley, J.; Swingle, S. Seawater irrigation of halophytes for animal feed. In: Choukr-Allah R. Malcolm C.V. Hamdy A. Halophytes and biosaline agriculture. New York: M. Dekker, v.11, p.221-236. 1995.

Glenn, E.P.; Olsen, M.; Frye, R.; Moore, D.; Miyamoto, M. How much sodium accumulation is necessary for salt tolerance in subspecies of the halophyte, *Atriplex canescens* ? Plant Cell Environ., v.17, p.711-719, 1994.

Glenn, E.P.; Pfister, R.; Brown, J.; Thompson, T.L.; O'Leary, J. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> accumulation and salt tolerance of *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae) genotypes. Am. J. Bot., v.83, p.997-1005, 1996.

Glenn, E.; Tanner, R.; Miyamoto, S.; Fitzsimmons, K.; Boyer, J. Water use, productivity and forage quality of the halophyte *Atriplex nummularia* grown on saline waste water in a desert environment. Journal of Arid Environments, v.38, p.45–62, 1998.

Glenn, E.P.; Brown, J.J. Salt Tolerance and Crop Potential of Halophytes. Critical Reviews in Plant Sciences, v.18, n.2, p.227-255, 1999.

Groef, C.P.L.; Johnston, M.; Brownell, P.F. Effect of sodium on the ultrastructure of chloroplasts of C<sub>4</sub> plants. Plant Physiology, v.89, p.539-543. 1989.

Goes, E.S. de - O Problema de Salinidade e Drenagem em Projetos de Irrigação do Nordeste e a Ação da Pesquisa com vistas a seu Equacionamento, IN: Anais da reunião sobre salinidade em áreas irrigadas, Min. do Interior/SUDENE, Fortaleza, 4 e 5 de maio de 1978.

Gorham, J. Mechanism of salt tolerance of halophytes. In: Choukr-Allan R, Malcolm C.V, Hamdy A, (eds). Halophytes and biosaline agriculture. New York: Marcel Dekker, Inc.,p.31-53, 1995.

Gouia, H.; Ghorbal, M.H.; Touraine, B. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and NO<sub>3</sub> reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant Physiology*, v.105, p.1409-1418, 1994.

Grieve, C.M.; Grattan, S.R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, v.70, p.303-307, 1983.

Greenway, H. Growth stimulation by high chloride concentrations in halophytes. *Israel Journal of Botany*, v.17, p.169-177, 1968.

Gruwel, M.L.H.; Rauw, V.L.; Loewen, M.; Abrams, S.R. Effects of sodium chloride on plant cells; a <sup>31</sup>P and <sup>23</sup>Na NMR system to study salt tolerance. *Plant Science*, v.160, p.785-794, 2001.

Greenway, H.; Munns, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, v.30, p.149-155, 1980.

Guimarães Duque. Obras contra as secas: objetivos, programas, ação da inspetoria, resultados. *Boletim da Inspetoria Federal de Obras Contra as Secas*, Rio de Janeiro, v.10, n.2, p.157-197, 1938.

Handa, S.; Handa, A.K.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A. Proline accumulation and the adaptation of cultures plants cells to water stress. *Plant Physiology*, v.80, p.938-945, 1986.

Hanson, A.D.; Nelsen, C.E. Betaine accumulation and [<sup>14</sup>C] formate metabolism in water-stressed barley leaves. *Plant Physiology*, v.62, p.305-312, 1978.

Hanson, A.D.; Hitz, W.D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annual Review of Plant Physiology*, v.33, p.163-203, 1982.

Hanson, A.D.; May, A.M.; Grumet, R.; Bode, J.; Jamieson, G.C.; Rhodes, D. Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.82 p.3678–3682, 1985

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

Hare, P.D.; Cress, W.A.; Van Staden, J. Dissecting the roles of compatible osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ*, v.21, p.535–553, 1998.

Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A.; Zhu, J.K.; Bohnert, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiol Plant Molecular Biology*, v. 51, p.463–499, 2000.

Hellebust, J.A. Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol*, v. 27, p.485-505, 1976.

Herbers, K.; Sonnewald, U. Molecular determinations of sink strength. *Current Opinion of Plant Biology*, v.1, p.207-216, 1998.

Herrera, O. Uso das águas salobras no cultivo de plantas. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), São Bento do Una, PE. 2001.

Hoagland, D.R; Arnon, D.I. the water cultured method for growing plants without soil. Circular n.º347. California Agricultural Experiment Station. 32p. 1950.

Holanda, J. S. & Amorim, J. R. A. Qualidade da água para irrigação. Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 26. Campina Grande, 1997. 33p.

Holmstrom, K.O.; Mantyla, E.; Welin, B.; Mandal, A.; Tapio Palva, E.; Tunnela, O.E.; Londesborough, J. Drought tolerance in tobacco. *Science*, v.379, p.683-684, 1996.

Hsiao, T.C. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, v.24, p.519-570, 1973.

Ingram, J.; Bartels, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.47, p.377-403, 1996.

Irigoyen, J.J.; Emerich, D.W.; Sánchez-Díaz, M. Water stress induced changes in concentrations of praline and total soluble sugars in nodulated alfafa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, v.84, p. 55-66. 1992.

Ishitani, M.; Nakamura, H.; Ham, S.Y.; Takabe, T. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acids. *Plant Mol. Biol.*, v.27, p.307-315, 1995.

Jacoby, B. Mechanism involved in salt tolerance by plants. – In *Handbook of plant and crop stress* (M. Pessarakli, ed.), p.97-124, 1994. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

Jones, H.G.; Corlett, J.E. Current topics in drought physiology. *Journal of Agricultural Science*, v.119, p. 291-296, 1992.

Kameli, A.; Losel, D.M. contribution of carbohydrates and solutes to osmotic adjustment in wheat leaves under water stress. *Journal Plant Physiology*, v.145, p.363-366, 1995.

Keles, Y.; Oncel, I. Response of antioxidative defense system to temperature and water stress combination in wheat seedling. *Plant Science*, v.163, p.783-790, 2002.

Khan, M.A.; Ungar, I.A.; Showalters, A.M, Dewald, H.D. NaCl-induced accumulation of glycinebetaine in four subtropical halophytes from Pakistan. *Physiologia plantarum*, v.102, p.487-492, 1998.

Khan, M.A.; Ungar, I.A.; Showalters, A.M. Effects of salinity on growth, water relations and ion accumulation of the subtropical perennial halophyte, *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Annals of botany*, v.85, p.225-232, 2000.

Knight, H.; Kinight, M.R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, v.6, n.6, p.262-267, 2001.

Koheil, M.A.H.; Hilal, S.H.; El-Alfy, T.S.; Leistner, E. Quaternary ammonium compounds in intact plants and cell suspension cultures of *Atriplex semibaccata* and *Atriplex halimus* during osmotic stress. *Phytochemistry*, v.31, p.2003-2008, 1992.

Koryo, H-W. Study of potential cash crop halophytes in a quick check system task. *Veg. Science*, v.38, p.5-17, 2003.

Koyro, H.W. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Environmental and Experimental Botany*, v.56, n.2p.136-146, 2006.

Kurkova, E.B.; Balnokin, Y.V. Pinocytosis and its possible role in ion transport in halophyte salt-accumulating organ cells. *Fiziol. Biokhim. Rast. (Moscow)*, v.41, p.578-582, 1994.

Kurth, E.; Cramer, G.R.; Lauchli, A.; Epstein, E. Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on cell enlargement and cell production in cotton roots. *Plant Physiology*, v.82, p.1102-1106, 1986.

Lacerda, C.F. Efeitos da salinidade no desenvolvimento e composição mineral do feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L) Walp e utilização do  $\text{Ca}^{2+}$  como meio para minorar tais efeitos. UFC, Fortaleza. Dissertação de Mestrado. 87p. 1995.

Lacerda, C.F.; Cambraia, J.; Cano, M.A.O.; Ruiz, .H.A.; Prisco, J.T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, v.47, n.2, p.107-120, 2003.

Last, D.I.; Llewellyn, D.J. Antifungal proteins from seeds of Australian native plants and isolation of an antifungal peptide from *Atriplex nummularia* Lindl. *New Zealand Journal of Botany*, v.35, n° 3, p.385-394, 1997.

Lambers, H. Dryland salinity: a key environmental issue in southern Australia. *Plant and Soil*, v.257, p.5-7, 2003.

Levitt, J. Responses of plant to environmental stresses, second edition, vols I and II. Academic Press, New York and London, 1980.

Lieth, H.; Moschenko, M.; Lohmann, M.; Koryo, H-H.; Hamdy, A. Halophyte uses in different climates. I. Ecological and Ecophysiological Studies. Backhuys Publishers, Leiden, 258p, 1999.

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

Lutts, S.; Majerus, V.; Kinet, J.M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 105, p. 450-458, 1999.

Lutts, S.; Kinet, J.M.; Bouharmont, J. NaCl-induced senescence in leaves of rice( *Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.*, v.78, p.389-398, 1996.

Lutts, S.; Lefevre, I.; Delperée, C.; Kivits, S.; Dechamps, C.; Robledo, A.; Correal, E. Heavy metal accumulation by the halophyte species Mediterranean saltbush. *Journal of Environmental Quality*, v.33, p. 1271-1279. 2004.

Maathuis, F.J.M.; Flowers, T.J., Yeo, A.R. Sodium chloride compartmentation in leaf vacuoles of the halophytes *Suaeda maritima* (L.) Dum. And its relation to tonoplast permeability. *J. Exp. Bot.* v.43, p.1219-1223, 1992.

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

Maggio, A.; Reddy, M.P.; Joly, R. J. Leaf gas exchange and solute accumulation in the halophyte *Salvadora persica* grown at moderate salinity. *Environmental and Experimental Botany*, v.44, p.31-38. 2000.

McCue, K.F.; Hanson, A.D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotech*, v.8, p.:358–362, 1990.

Mckell, C.M. Salinity tolerance in Atriplex species: Fodder shrubs of arid lands. In: Pessaraki P, ed. *Handbook of plant and crop stress*. New York: Marcel Dekker, inc., p.497-503, 1994.

Malavolta E.; Vitti G.; Oliveira S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: potafos. p.201. 1997.

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

Marcum, K.B.; Murdoch, C.L. Salt tolerance of the coastal salt marsh grass, *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth. *New Phytol*, v.120, p.281-288, 1992.

Marcum, K.B. Salt tolerance in the grass (Poaceae) subfamily chloridoideae. In: Biology of salt tolerance plants ( Khan, M.A and Ungar, I.A, eds), p.231-237, 1995.

Maia, J.M. Efeitos aditivos e interativos de tratamentos de seca e NaCl na resposta antioxidativa de raízes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L.). Dissertação de mestrado, UFC, Fortaleza, CE, 126p, 2004.

Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, London, 1995, 889p.

Matoh, T.; Watanabe, J.; Takahashi, E. Effects of sodium and potassium salts on the growth of a halophyte *Atriplex gmelini*. Soil Science and Plant Nutrition, v.32, p.451–459, 1986.

Martínez, J.P.; Ledent, J.F.; Bajji, M.; Kinet, J.M.; Lutts, S. Effect of water stress on growth, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> accumulation and water use efficiency in relation to osmotic adjustment in two populations of *Atriplex halimus* L. Plant Growth Regulation, v.41, p.63–73, 2003.

Martínez, J.P.; Lutts, S.; Schanck, A.; Bajji, M.; Kinet, J.M. Is osmotic adjustment required for water-stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L.? Journal of Plant Physiology, v.161, p.1041–1051, 2004.

Martínez, J.P.; Kinet, J.M.; Bajji, M.; Lutts, S. NaCl alleviates polyethylene glycol-induced water stress in the halophyte species *Atriplex halimus* L. Journal of Experimental Botany, v.56 (419), p.2421-2431, 2005.

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

Maurel, P. Aquaporins and water permeability of plant membranes. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol, v.48, p.399-429, 1997.

Medeiros, J.F. de; Gheyi, H.R. Manejo do sistema solo-água-planta em solos afetados por sais. In: Gheyi, H.R.; Queiroz, J.E.; Medeiros, J.M. (ed.) Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. Campina Grande: UFPB/SBEA, 1997. p. 239-288.

Mexal, J.; Fisher, J.T.; Osteryonng, J.; Reid, C.P.P. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant-water relations. *Plant Physiology*, v.55, p.20-24, 1975.

Miyazawa M.; Pavan, M. A.; Bloch, M. F. M. Avaliação de métodos com e sem digestão para extração de elementos em tecidos de plantas. *Ciência e Cultura*, v.36, p. 1953-1958. São Paulo. 1984.

Moghaieb, R.E.A.; Saneoka, H.; Fujita, K. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima*. *Plant Science*, v.166, p.1345-1349, 2004.

Mozafar, A.; Goodin, J.R. Vesiculated hairs: a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus* L. *Plant Physiology*, v.45, p.62–65, 1970.

Mozafar, A.; Goodin, J.R.; Oertli, J.J. Na and K interactions in increasing the salt tolerance of *Atriplex halimus* L. II. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uptake characteristics. *Agronomy Journal*, v.62, p. 481-484. 1970.

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

Mullet, J.E.; Whitsitt, M.S. Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regulation*, v.20, n.2, p.119-124, 1996.

Munns, R. Why measure osmotic adjustment? *Australian Journal of Plant Physiology*, v.15, p.717-726, 1988.

Munns, R. Physiological process limiting plant growth in saline soils – some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.*, v.16, p.15-24, 1993.

Munns, R.; Schachtman, D.P.; Condon, A.G. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.22, p.561–569, 1995.

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

Murakeozy, E.P.; Nagy, Z.; Duhazé, C.; Bouchereau, A.; Tuba, Z. Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. *J. Plant Physiol*, v.160, p.395-401, 2003.

Murata, S.; Kobayashi, M.; Maton, T.; Sekiya, J. Sodium stimulates regeneration of phosphoenolpyruvate in mesophyll chloroplasts of *Amaranthus tricolor*. *Plant Cell Physiology*, v.33, p. 1247-1250. 1992.

Naidoo, G.R.; Rughunanan, R. Salt tolerance in the succulent halophyte, *Sarcocornia natalensis*. *Journal of Experimental Botany*, v.41, p.497-502.

Nerd, A.; Pasternak, D. Growth, ion accumulation, and nitrogen fractioning in *Atriplex barclayana* growth at various salinities. *J. Range Manage*, v.45, p.164-166, 1992.

Niu, X.; Narasimhan, M.L.; Salzman, R.A.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. NaCl regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant physiol*, v.103, p.713-718, 1993(a).

Niu, X.; Zhu, J.K.; Narasimhan, M.L.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. Plasma-membrane H(+)-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta*, v.190, n.4, p.433-438, 1993(b).

Nobel, P.S. Topics in Environmental Physiology. In: Salisbury, F.B.; Ross, C.W. *Plant Physiology*. California: Wadsworth Publishing Company, 4<sup>a</sup> ed., 1992.

Nonami H, Wu Y, Boyer JS. 1997. Decreased growth-induced water potential: a primary cause of growth inhibition at low water potentials. *Plant Physiology* 114, 501–509

O’Leary, J.W. A critical analysis of the use of *Atriplex* species as crop plant for irrigation with highly saline water. In: Ahmad, R; San Pietro, A. Ed. *Prospects for biosaline research*. Pakistan: Karachi University, Botany Dept., p.416-432, 1986.

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

Osmond, C.B.; Björkman, O.; Anderson, D.J. *Physiological processes in plant ecology*. Springer-Verlag, New York, 1980.

Ohta, M., Hayashi, Y., Nakashima, A., Hamada, A., Tanaka, A., Nakamura, T. and Hayakawa, T. (2002) Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett.* 532: 279–282.

Ohnishi, J.; Flügge, U.; Heldt, H.W.; Kanai, R Involvement of Na<sup>+</sup> in active uptake of pyruvate in mesophyll chloroplasts of some C<sub>4</sub> plants: Na<sup>+</sup>/pyruvate cotransport. *Plant Physiology*, v.94, p. 950-959. 1990.

Paleg, L.G.; Aspinall, D. *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic Press, Sydney, Australia, 1981.

Papageorgiou, G.C.; Murata N. The unusually strong stabilizing effects of glycinebetaine on the structure and function of oxygen-evolving photosystem-II complex. *Photosynthet Res*, v.44, p.243-252, 1995.

Pasternak, D. (compiler). Fodder production with saline water, Project Report, January 1982-December 1989. Report No. BGUN-ARI-35-90. The Institutes for Applied Research, Ben-Gurion University of The Negev, Beer-Sheva, p.113-173, 1990.

Pasternak, D.; Nerd, A. Research and utilization of halophytes in Israel. In: Malcolm, L.; Hamdy, A. (Eds.), *Halophytes and Biosaline Agriculture*. Marcel Dekker, New York, USA, p.325-348, 1996.

Pastori, G.M.; Foyer, C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "Redox" and abscisic acid-mediated controls. Update on stress tolerance. ***Plant Physiology***, v.129, p.460-468. 2002.

Peng, Y.H.; Zhu, Y.F.; Mao, Y.Q.; Wang, S.M.; Su, W.A, Tang, Z.C. Alkali grass resist salt stress through high  $K^+$  and an endodermis barrier to  $Na^+$ . *Journal of Experimental Botany*, v.55, p.939-949, 2004.

Peoples, M.B.; Faizah, A.W.; Reakasem, B.; Herridge, D.F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 76p, 1989.

Pereira, J.R.; Valdiviesco, C.R.; Cordeiro, G.G. Recuperação de solos afetados por sódio através do uso de gesso. In: *Seminário sobre o uso de fosfogesso na agricultura*, 1, 1985, Brasília. Resumos...Brasília, 1985, p.85-105.

Prisco, J.T.; Pahlich, E. Recent Advances on the physiology of water and salt stresses. In: *Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 2, Piracicaba. Anais...Piracicaba.SBFV; ESALQ, 1989, p.24.

Poljakoff-Mayber, A. Morphological and anatomical changes in plants as a response to salinity stress. In: Poljakoff-Mayber, A.; Gale, J. (Eds). Plants in saline environments. New York: Springer-Verlag, p.97-117, 1975.

Popp, M. Salt resistance in herbaceous halophytes and mangroves. Progr Bot, v.56, Springer, Berlin, p.416-429, 1995.

Popp, M.; Albert, R. The role of organic solutes in salinity adaptation of mangroves and herbaceous halophytes. In: Ajmal Khan M, Ungar IA (eds) Biology of Salt Tolerance Plants, Ch.16. University of Karachi, Pakistan, p.139-149, 1995.

Porto, E.R.; Amorim, M.C.C. de.; Araújo, O.J.; Silva Júnior, L.G.A. Aproveitamento dos rejeitos da dessalinização. In: Simpósio sobre captação de água de chuva no semi-árido Brasileiro, v.1, Petrolina, PE, 1997.

Porto, E.R.; Araújo, G.G. Erva sal (*Atriplex nummularia*). EMBRAPA SEMI-ÁRIDO. Instruções técnicas n.º22. Petrolina, PE, 1999.

Porto, E.R.; Araújo, G.G. Uso da erva sal (*Atriplex nummularia*) como forrageira irrigada com água salobra. Embrapa semi-árido. Circular técnica n.º53. Petrolina, PE, 2000.

Qiu, N.; Lu, C. Enhanced tolerance of photosynthesis against high temperature damage in salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica* plants. Plant Cell Environ.,v.26, p.1137–1145, 2003.

Rabe, E. Stress Physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. Journal of Horticultural Science, v.65, p.231-243, 1990.

Rabe, E. Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. In: Handbook of plant and crop science, New York: Mohammad Passaraki, 1993.

Ramos J, López MJ, Benlloch M. Effect of NaCl and KCl salts on the growth and solute accumulation of the halophyte *Atriplex nummularia*. Plant and Soil, v.259, p.163–168, 2004.

Rathinasabapathi, B. Metabolic Engineering for Stress Tolerance: Installing Osmoprotectant Synthesis Pathways. *Annals of Botany*, v.86, p.709-716, 2000.

Reimann, C.; Breckle, S.W. Sodium relations in Chenopodiaceae: a comparative approach. *Plant, Cell and Environment*, v.16, p.323-328. 1993.

Richardson, S.G.; MCKell, C.M. Water relations of *Atriplex canescens* as affected by salinity and moisture percentages of processed oil shale. *Agronomy Journal*, v.72, p. 946-950. 1980.

Richardson, S.G.; McCree, K.J. Carbon balance and water relations of sorghum exposed to salt and water stress. *Plant Physiology*, v.79, p.1015-1020, 1985.

Rocha, I.M.A. Regulação metabólica da acumulação de prolina em folhas de cajueiro expostas ao estresse salino. Fortaleza: UFC, 2003.104p. Tese Doutorado.

Rodriguez-Navarro, A. Potassium transport in fungi and plants. *Biochem. Biophysiol Acta*. v.1469, p.1-30, 2000.

Rodríguez, H.G.; Roberts, J.K.M.; Jordan, W.R.; Drew, M.C. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiology*, v.113, p.881-893, 1997.

Rhodes, D.; Hanson, A.D. Quarternary ammonium and tertiary sulphonium compounds of higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* v.44, p.357-384, 1993.

Rhoades, J.D.; Kandiah, A.; Mashali, A.M. The use of saline waters for crop production- FAO irrigation and drainage paper 48. [S.I], 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/T0667E/t0667e08.htm#TopOfPage>. Acesso em: 19 dez 2003.

Rengasamy, P.; Chittleborough, D.; Helyar, K. Root-zone salinity and plant-based solutions for dryland salinity. *Plant and Soil*, v.257, p.249-260, 2003.

Rogers, M.E.; Noble, C.L. Variation in growth and ion accumulation between two selected populations of *Trifolium repens* L. differing in salt tolerance *Plant and Soil*, v.146, p.131-136, 1992.

Sakamoto, A.; Alia.; Murata, N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology*, v.38, p.1011-1019, 1998.

Sakurai N, Kuraishi S (1988) Water potential and mechanical properties of the cell-wall of hypocotyls of dark-grown squash (*Cucurbita maxima* Duch.) under water-stress condition. *Plant Cell Physiol* 29: 1337-1343

Salisbury, F.B.; Ross, C.W. *Plant Physiology*. California: Wadsworth Publishing Company, 4<sup>a</sup> ed., 1992.

Samaras, Y.; Bressan, R.A.; Csonka, L.N.; Garcia-Rios, M.G.; Paino D'Urzo, M.; Rhodes, D. Proline accumulation during drought and salinity. In: Smirnov N, ed. *Environment and plant metabolism, flexibility and acclimation*, Oxford: BIOS, p.161-188, 1995.

Santa-Cruz, A.; Martinez-Rodriguez, M.M.; Perez-Alfocea, F.; Romero-Aranda, R.; Bolarin, M.C. The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. *Plant Science*, v.162, p.825-831, 2002.

Sakamoto, A.; Murata, N.; Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implication for enhancement of stress tolerance. *Journal of experimental botany*, v.51, p.81-88, 2000.

Santos, R.V.; Muraoka, T. Interações salinidade e fertilidade do solo. In: XXVI Congresso brasileiro de engenharia agrícola, 26, 1997. Campina Grande. Anais...Campina Grande, UFPB, p.289-317, 1997.

Saarruge, JR; Haag, H.P. Análise química de plantas. Piracicaba. Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 56 p. 1974.

Sakurai, N.; Kuraishi, S. Water potential and mechanical properties of the cell wall of hypocotyls of dark-grown squash (*Cucurbita maxima* Duch.) under water-stress conditions. *Plant Cell Physiology*, v.29, n.8, p.1337-1343, 1988.

Schulze, E.D. Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and soil. *Annual Review of Plant Physiology*, v.37, p.247-274, 1986.

Smekens, M.J.; Tienderen, P.H. Genetic variation and plasticity of *Plantago coronopus* under saline conditions. *Acta Oecol.Int.J.Ecol*, v.22, p.187-200, 2001.

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

Serrano, R.; Rodriguez-Navarro, A. Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion Cell Biololgy*, v.13, p.399-404, 2001.

Shen, Y.G.; Zhang, W.K.; Yan, D.Q.; Du, B.X.; Zhang, J.S.; Liu, Q.; Chen, S.Y. Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.107, p.155-161, 2003.

Short, D.C.; Colmer, T.D. Salt tolerance in the halophyte *Halosarcia pergranulat* a subsp. *Pergranulat*, *Ann. Bot.*, v.83, p.207-213, 1999.

Siew, P.; Klein, C.R. The effect of NaCl on some metabolic and fine structural changes during the greening of etiolated leaves. *J.cell Biol*, v.37, p.590-596, 1969.

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, p.115-123, 2003.

Singh, K.B.; Foley, R.C.; Oñate-Sánchez. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, v.5, p.430-436, 2002.

Slavick, B. *Methods of studying plant water relations*. New York, springer verlong, 1974. 449p.

Smirnoff, N.; Cumbes, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, v.28, p.1057-1060, 1989.

Sonneveld, U. Sugar sensing and regulation of photosynthetic carbon metabolism. In: Aro, E.M.; Andersson, B. (eds), *Advances in Photosynthesis and respiration*, v.11. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p.109-120, 2001.

Song, J.; Feng, G.; Tian, C.Y.; Zhang, F.S. Osmotic adjustment traits of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* in field or controlled conditions. *Plant Science*, v.170, p.113-119, 2006.

Souza, H.R. de - O impacto da Irrigação sobre o Desenvolvimento do Semi-árido Nordeste: Situação Atual e Perspectivas, *Revista Econômica do Nordeste*, Vol. 21, ndeg. 3/4, p. 481-516, Fortaleza-CE, 1990.

Stajner, D. Mimica-Dukic, N, Gasic, O. Adaptability to drouht in sugar beet cultivars. *Biologia Plantarum*, v.37, p.107-112, 1995.

Stewart, G.R, Larher, F.; Ahmad, I. Nitrogen metabolism and salt tolerance in higher plant halophytes. In: Jefferies, R.L; Davy, A.J. (eds) *Ecological processes in coastal environments*. Blacwell scientific publication, London, p.211-227, 1979.

Stienstra, A.W. Nitrate accumulation and growth of *Aster tripolium* L. with a continuous and intermittent nitrogen supply. *Plant Cell Environ*, v.9, p.307-313, 1986.

Storey R, Wyn Jones, R.G. Responses of *Atriplex spongiosa* and *Suaeda monoica* to salinity. *Plant Physiology*, v.63, p.156-162, 1979.

Storey, R.; Pitman, M.G.; Stelzer, R.; Carter, C.X-ray micro-analysis of cells and cell compartments of *Atriplex spongiosa*. *Journal of Experimental Botany*, v.34, p.778-794. 1983.

Strange, K. Cellular volume homeostasis. *Advances in Physiology Education.*, v.28, p.115-159, 2004.

Subbarao, G.V.; Wheeler, R.M.; Levine, L.H.; Stutte, G.W. Glicinebetaine accumulation, ionic and water relations of redbeet at contrasting levels of sodium supply. *Journal plant physiology*, v.158, p.767-776, 2001.

Szabolcs, I. Prospect of soil salinity for th 21th century. 15th Trans World Congress of soil Sciences. Mexico, Acapulco, p.123–141, 1994.

Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant Physiology*, tradução de Santarém, E.R. et al. 3.ed. Porto Alegre, RS: ARTMED, 2004. 719p.

Tan, W.; Blake, T.J.; Boyle, J.B. Drought tolerance in faster- and slower-growing black spruce (*Picea mariana*) progenies: II. Osmotic adjustment and changes of soluble carbohydrates and amino acids under osmotic stress. *Physiologia Plantarum*, v.85, p.645-651, 1992.

Tattini, M.; Montagni, G.; Traversi, M.L. Gas exchange, water relations and osmotic adjustment in *Phyllyrea latifolia* grown at various salinity concentrations. *Tree Physiology*, v.22, p.403-412, 2002.

Thakur, P.S.; Rai, V.K. Dynamics of amino acid accumulation of two differentially drought resistant *Zea mays* cultivars in response to osmotic stress. *Environmental and Experimental botany*, v.22, p.221-226, 1982.

Termaat, A.; Munns, R. Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant growth. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.13, p.509-522, 1986.

Tester, M.; Davenport, R. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of botany*, v.91, p.503-527, 2003.

Teulat, B.; Monneveux, P.; Wery, J.; Borries, C.; Souyris, I.; Charrier, A.; This, D. Relationships between Relative Water Content and Growth Parameters under Water Stress in Barley: A QTL Study. *New Phytologist*, v.137, n.1, p. 99-107, 1997.

Turner, N.C.; Jones, M.M. Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. In: adaptation of plant to water and high temperatures stress (Turner, N.C.; Kramer, P.J. eds), p.87-103, Wiley, New York, 1980.

Ungar, I.A. *Ecophysiology of vascular halophytes*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991.

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.

Van Heerden, P.D.R., De Villiers, O.T. Evaluation of proline accumulation as an indicator of drought tolerance in spring wheat cultivars. *South African Journal of Plant and Soil*, v.13, p.17-21, 1996.

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 de Fisiologia Vegetal*. Viçosa, v.11, n.3, p.153-159, 1999.

Volkmar, K.M., Y. Hu, and H. Steppuhn. . Physiological responses of plants to salinity: a review. *Can. J. Plant Sci.* v.78, p.19-27, 1998.

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

Waisel, Y. *Biology of halophytes*. New York, London: Academic Press, 1972.

Wang, H.; Qi, Q.; Schorr, P.; Cutler, A.J.; Crosby, W.L.; Fowke, L.C. ICK1, a cyclin dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycDa, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant Journal*, v.15, p.501-510, 1998.

Wang, Z.L.; Huang, B.R.; Xu, Q.Z. Effects of abscisic acid on drought responses of Kentucky bluegrass. *J Am Soc Hort Sci*, v.128, p.36-41, 2003.

Wang, L.W.; Showalter A.M. Cloning and salt-induced, ABA independent expression of choline mono-oxygenase in *Atriplex prostate*. *Physiologia Plantarum*, v.120, p.405-412, 2004.

Wang, Y.M.; Meng, Y.L.; Nii, N. Changes in glycine betaine and related enzyme contents in *Amaranthus tricolor* under salt stress. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 30: 496-502, 2004.

Weretilnyk, E.A.; Hanson, A.D. "Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity." *Arch Biochem Biophys*, v. 271, n.1, p.56-63, 1989.

Williams M.C.; Effect of sodium and potassium salts on growth and oxalate content of *Halogeton*. *Plant Physiology*, v.35, p.500-505. 1960.

Wilson, C.; Lesch, S.M.; Grieve, C.M. Growth stage modulates salinity tolerance of New Zealand spinach (*Tetragonia tetragonioides* Pall.) and red orach (*Atriplex hortensis* L.). *Annals of Botany*, v.85, p.501-509. 2000.

Winicov, I.; Bastola, D.R. Salt tolerance in crop plants: new approaches through tissue culture and gene regulation. *Acta Physiol.Plant.* v.19, p.435–449, 1997.

Winicov, I. (1998). New Molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Annals of Botany* 82, 703-710.

Wright, S. Alguns dados da física e da química das águas dos açudes nordestinos. *Boletim técnico/DNOCS, Fortaleza*, 39(1): p.21-31, 1981.

Wyn Jones, R.G.; Gorham, J. Osmoregulation. In: *Encyclopedia of plant physiology, new series*, v.12C, (Lange, O.L.; Nobel, P.S.; Osmond, C.B.; Ziegler, H., eds), p.35-58, 1983. Springer-Verlag, New York.

Yancey, P.H.; Clarke, M.E.; Hand, S.C.; Bowler, R.D.; Somero, G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems.-*Science*, v.217, p.1214-1222, 1982.

Yang, G.; Rhodes D.; Robert J.J. Effects of high temperature on membrane stability and glycinebetaine-containing maize lines. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.23, p.437-443, 1996.

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

Zid, E.; Boukhris, M. Quelques aspects de la tolérance de l'*Atriplex halimus* L. au chlorure de sodium. *Oecologia Plantarum*, v.12, p.351-362, 1977.

Zhang, J.; Nguyen, H.T.; Blum, A. Genetic analysis of adjustment in crop plants. *Journal of experimental botany*, v.50, p.291-302, 1999.

Zhu, J.K. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, v.6, p.56-71, 2001a.

Zhu, J.K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, p.401-406, 2001b.

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