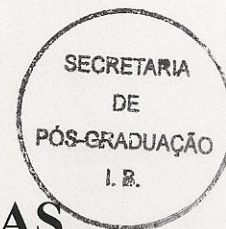


CLAUDIA APARECIDA LONGATTI

EFEITO DE BRASSINOSTERÓIDE NO CRESCIMENTO,
METABOLISMO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE
Cajanus cajan NODULADAS E SOB ESTRESSE SALINO

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CLAUDIA APARECIDA LONGATTI

**EFEITO DE BRASSINOSTERÓIDE NO CRESCIMENTO,
METABOLISMO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE
Cajanus cajan NODULADAS E SOB ESTRESSE SALINO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Claudia Aparecida Longatti
mtchiavinato
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

**CAMPINAS,
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L855e

Longatti, Claudia Aparecida, 1970-
Efeito de brassinosteróide no crescimento,
metabolismo e fixação de nitrogênio em plantas de
Cajanus cajan noduladas e sob estresse salino / Claudia
Aparecida Longatti. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marlene Aparecida Schiavinato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Salinidade. 2. Cloreto de sódio. 3. Guandu.
4. Leguminosa. 5. Longevidade foliar. 6.
Senescência foliar. 7. Brassinosteróides. I.
Schiavinato, Marlene Aparecida, 1953-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effect of brassinosteroid on growth, metabolism and nitrogen fixation in *Cajanus cajan* nodulated plants, under salt stress

Palavras-chave em Inglês:

Salinity

Sodium chloride

Pigeon pea

Legumes

Leaf longevity

Leaf senescence

Brassinosteroids

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Marlene Aparecida Schiavinato [Orientador]

Sara Adrián López de Andrade

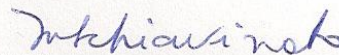
Emerson Alves da Silva

Data da defesa: 31-08-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato (Orientadora)



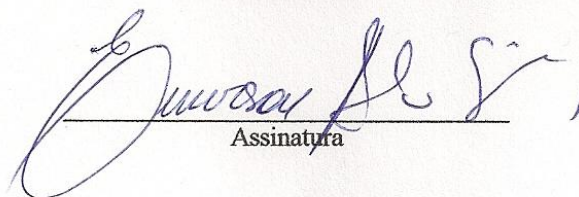
Assinatura

Dra. Sara Adrián López de Andrade



Assinatura

Dr. Emerson Alves da Silva



Assinatura

Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa

Assinatura

Dra. Adriana Parada Dias da Silveira

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradecer seria pouco, simplesmente agradecer aqueles que contribuíram para o acontecimento dessa dissertação, se eu tivesse que agradecer, talvez muito obrigado não bastasse.

À Universidade Estadual de Campinas que tornou possível a realização dessa dissertação.

Sou profundamente grata a minha orientadora Dra. Marlene Aparecida Schiavinato, por me aceitar como sua orientanda, por confiar em mim e me apoiar em todos esses anos, mais que minha orientadora, uma amiga.

A Dra. Claudia Regina Baptista Haddad, que ajudou-me com sua paciência e dedicação a ter mais fé em mim e a acreditar que eu poderia chegar lá apesar de tudo.

Agradeço aos professores convidados para a banca examinadora, Dra. Sara, Dr. Emerson, Dra. Ana Maria e Dra. Adriana, por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho.

Foram tantos amigos que se dispuseram a ajudar, tantas mãos me amparando em momentos difíceis, tantas conversas, tantas horas no laboratório e na estufa, que se não fossem esses amigos talvez hoje essa dissertação não tivesse chegado ao fim.

Agradeço aos amigos Lucas dos Anjos e Sara Caroline pelo apoio e explicações sobre os programas de estatística, à Luciana por sua paciência em me explicar as análises, à Sarita por ficar comigo horas a fio no laboratório, pelas conversas e incentivos, ao Luciano, que me ajudou com os gráficos e tabelas e me ouviu nos momentos mais difíceis, com sua paciência e sempre com uma palavra amiga e de incentivo.

Agradeço aos técnicos de laboratório Néia, Dulce e Denise por me ajudarem nas preparações das análises e fazerem tudo com tanto carinho e dedicação.

Agradeço ao meu marido Maurício pelo apoio e pela paciência, por deixar que eu estudasse quase todos os fins de semana nesses 3 anos, as minhas filhas Gabriela e Amanda que apesar do orgulho que sentem de mim, não viam a hora em que tudo isso terminasse, para que pudéssemos ter nossas férias de volta.

Não poderia deixar de agradecer às plantas de feijão guandu que deram suas vidas para que essa pesquisa fosse realizada.

E que essa energia que emana de Deus possa nos guiar sempre.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Efeitos do estresse salino em plantas	1
1.2 Efeito da salinidade na fixação de nitrogênio e em processos de economia desse nutriente.....	5
1.3 Brassinosteróides.....	7
1.4 Descrição da planta.....	10
2. OBJETIVO.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Delineamento experimental	13
3.2 Material vegetal e condições de cultivo.....	13
3.3 Caracterização das folhas	14
3.4 Exposição das plantas ao NaCl e ao brassinosteróide.....	15
3.5 Medidas de crescimento.....	16
3.6 Avaliações dos parâmetros bioquímicos	17
3.6.1 Dosagem de proteína nas folhas.....	17
3.6.2 Dosagem de aminoácidos livres totais nas folhas.....	17
3.6.3 Dosagem de malondialdeído	17
3.6.4 Determinação de nitrogênio total e cálculos dos mecanismos de conservação de nitrogênio (proficiência de reaproveitamento e eficiência do uso de nitrogênio).....	18
3.6.5 Atividade específica da nitrogenase	19
3.6.6 Dosagem de pigmentos fotossintéticos.....	20
4. Análise estatística dos dados.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Efeitos da salinidade na longevidade foliar.....	21
5.2 Interação entre hormônio e salinidade.....	21
5.3 Efeitos do NaCl e do 24-epibrassinolídeo (Br) nos parâmetros de crescimento de plantas de <i>Cajanus cajan</i>	24
5.3.1 Análise de crescimento - folhas.....	24
5.3.2 Análise de crescimento – caule	27
5.3.3. Análise de crescimento - raízes.....	28
5.3.4 Análise de crescimento - nódulos.....	28
5.4 Efeitos da salinidade e do 24-epibrassinolídeo (Br) nos parâmetros bioquímicos em plantas de <i>Cajanus cajan</i>	31
5.4.1 Pigmentos.....	31
5.4.2 Nitrogênio total e mecanismos de conservação de nitrogênio.....	33
5.4.3 Peroxidação de lipídeos	35
5.4.4 Atividade da nitrogenase, teores de aminoácidos totais e proteínas totais.....	36
6. DISCUSSÃO.....	38

7. CONCLUSÃO.....	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

RESUMO

O metabolismo geral de uma planta pode ser afetado pelo excesso de sais no solo, visto que a salinidade pode causar reduções no crescimento e acelerar a senescência. Os brassinosteróides são hormônios vegetais envolvidos no aumento da tolerância a vários tipos de estresses, inclusive o estresse salino. Com o objetivo de avaliar a influência da aplicação de brassinosteróide no crescimento e metabolismo do nitrogênio em plantas de *Cajanus cajan* sob diferentes condições de estresse salino, plantas noduladas de *C. cajan* foram cultivadas em casa de vegetação na ausência ou presença de brassinosteróide (24-epibrassinolídeo), sob diferentes concentrações de NaCl (0 mM, 100 mM e 200 mM). A salinidade afetou o crescimento, reduzindo a área, o comprimento do caule, a longevidade foliar, o teor de umidade de folhas, caules e raízes, bem como a atividade da nitrogenase, os teores de pigmentos fotossintetizantes, de malondialdeído e de nitrogênio total em folhas verde maduras, e a proficiência e eficiência do uso de nitrogênio. A aplicação de brassinosteróide amenizou o efeito do NaCl nas reduções da área foliar e teores de clorofila *a* e total. Também atenuou o efeito do estresse salino na atividade da nitrogenase. Esse efeito positivo do brassinosteróide sobre a atividade da enzima refletiu-se no aumento da concentração de compostos nitrogenados nas folhas verde-maduras e reduziu, ainda, a perda de N nas folhas senescentes. A maior concentração de N total nas folhas verde-maduras de plantas tratadas com o 24-epibrassinolídeo levou à redução da eficiência de utilização desse elemento.

ABSTRACT

The general metabolism of a plant can be affected by salinity excess in soil, due to the fact that salinity can cause growth reduction and accelerate senescence. The brassinosteroids are plant hormones involved in increasing tolerance in several types of stress, including salt stress. In order to verify the influence of the application brassinosteroid on development and nitrogen metabolism in *Cajanus cajan* plants under different levels of salt stress, nodulated plants of *C. cajan* were cultivated in the greenhouse in the absence or presence of 24-epibrassinolide, under different concentrations of NaCl (0 mM, 100 mM and 200 mM). Salinity affected growth reducing leaf area, branch length, leaf longevity, moisture content of leaves, stems and roots, as well as activity of nitrogenase, amounts of photosynthetic pigments, malondialdehyde and total nitrogen in mature green leaves; nitrogen use proficiency and efficiency. The application of brassinosteroid attenuated the effect of NaCl on the leaf area and on the concentrations of chlorophyll *a* and total chlorophyll. The hormone also attenuated the effect of salt stress on the activity of nitrogenase. The positive effect of the hormone on the activity of the enzyme led to an increase in the concentration of nitrogenous compounds in the mature green leaves and reduced the lost of nitrogen in senescent leaves. The higher concentration of total nitrogen in mature green leaves of the plants treated with 24-epibrassinolide led to a reduction in nitrogen use efficiency.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Efeitos do estresse salino em plantas

Os solos salinos representam 10% das terras do planeta (Szabolcs, 1994). Além da salinização natural, práticas inadequadas de drenagem e irrigação com água salobra podem levar ao acúmulo de sais no solo (Flowers e Yeo, 1995; Tester e Davenport, 2003; Gondim *et al.*, 2010). Em regiões semiáridas ou de clima seco, tais como o nordeste e parte do norte de Minas Gerais no Brasil, esse acúmulo de sais é agravado, pois os solos possuem baixa capacidade de infiltração e lençol freático superficial, o que leva à salinização dos mesmos (Batista, 1991).

Devido à sua importância, o estresse salino é objeto de intensos estudos, visto que a salinidade diminui o potencial hídrico do solo reduzindo a possibilidade de absorção de água pelas plantas (Zhu, 2001; Munns e Tester, 2008). Essa redução de absorção ocorre porque, para manter a absorção de água e turgescência, as plantas necessitam que seu potencial hídrico interno seja menor que o potencial hídrico do solo (Umezawa *et al.*, 2002; Carillo *et al.*, 2005; Munns *et al.*, 2006).

Sabe-se que a salinidade inibe o crescimento e acelera a senescência de muitas plantas (Sharma, 1996; Aragão *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2011), pois afeta a produção de pigmentos fotossintéticos, como clorofilas e carotenóides (Behnamnia *et al.*, 2009), provocando, efeitos deletérios no metabolismo e reduções na produção de massa vegetal (Martins *et al.*, 2012).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são constantemente produzidas nas células e podem agir como mensageiros secundários em diversas vias de

transdução de sinais, modificando os padrões de expressão gênica e síntese protéica, possibilitando, dessa forma que a planta ajuste adequadamente seu metabolismo às condições ambientais (Dutilleul *et al.*, 2003; Foyer e Noctor, 2005a, b; Gratão *et al.*, 2005; Mhamdi *et al.*, 2010; Queval *et al.*, 2011). No entanto, em condições de estresse acontece um aumento na produção de ERO (Andrade *et al.*, 2009). As plantas podem eliminar o excesso de ERO em condições hídricas normais, através de atividades metabólicas antioxidantes, enzimáticas ou não (Behnamnia *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2011). Contudo, estresses diminuem a atividade do ciclo de Calvin, o que causa redução na oxidação de NADPH a NADP^+ . Se as plantas estiverem sob alta irradiância o fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons é interrompido, devido à falta de NADP^+ , levando ao aumento na produção de ERO (Szabados e Saviouré, 2009). As ERO em concentrações mais altas provocam oxidação de proteínas, DNA e lipídios, prejudicando o desenvolvimento da planta (Dutilleul *et al.*, 2003; Foyer e Noctor 2005a; Gomes *et al.*, 2007)

Muitos trabalhos indicam aumento da peroxidação lipídica em diferentes espécies vegetais, sob diversos tipos de estresse. Exemplos são os resultados encontrados com aroeira do sertão (Queiroz *et al.*, 2002) e plantas de milho (Viana, 2002) sob estresse hídrico, em plantas de arroz sob altas doses de chumbo (Verma *et al.*, 2003), em plantas de feijão sob altas concentrações de zinco (Andrade *et al.*, 2009) e em cafeeiros cultivados em baixa temperatura (Queiroz *et al.*, 1998). Segundo Behnamnia *et al.* (2009), em tomateiros, o conteúdo de peróxido de hidrogênio aumentou significativamente sob seca e quase triplicou sob seca severa, devido ao estresse oxidativo.

A presença de NaCl na solução do solo pode causar alterações na composição da membrana celular, visto que afeta a permeabilidade e a fluidez da membrana, podendo provocar aumento do conteúdo protéico e diminuição do conteúdo lipídico (Queiroz *et al.*, 1998). Exemplo disso foram às alterações na composição lipídica da membrana celular em soja, observadas por Zenoff *et al.* (1994). A inclusão protéica gera uma bicamada mais rígida, reduzindo assim a fluidez da membrana, acarretando, conseqüentemente, um menor crescimento da planta (Borochoy-Neori e Borochoy, 1991; Mansour *et al.*, 1993; Mansour, 1995; Racagni *et al.*, 2003/2004).

De acordo com Larcher (2000), os processos de crescimento são particularmente sensíveis ao efeito do estresse salino, de forma que a produção de massa é um bom critério para avaliação do grau de estresse e da capacidade da planta em resistir à salinidade. Plantas de leucena (Freire *et al.*, 2009) e de umbu (Silva *et al.*, 2008), cultivadas em solo salino, apresentaram redução em altura e plantas de vários genótipos de milho, sob o mesmo tipo de estresse, apresentaram redução no crescimento (Azevedo Neto *et al.*, 2004). O estresse salino também levou à redução da massa fresca de plantas de arroz (Nuñez *et al.*, 2003) e, em concentrações acima de 100 Mm, das massas secas de feijoeiros (Khadri *et al.*, 2001) e de cunhã (Martins *et al.*, 2012). Houve também redução da massa seca de raízes e parte aérea de *Prosopis alba*, sob altas concentrações de NaCl (600 mmol.L⁻¹), havendo maior inibição da parte aérea em relação às raízes (Meloni *et al.*, 2004). Segundo Silva *et al.*, (2008), houve redução do número de folhas em plantas de umbu cultivadas sob salinidade.

O estresse salino pode levar à diminuição nos teores de clorofila em diversas espécies vegetais, como trigo, cunhã (Sharma e Hall, 1991; Martins *et al.*, 2012) e arroz (Anuradha e Rao, 2003), afetando a fotossíntese. Segundo Anuradha e Rao, (2003), a diminuição da fotossíntese reduz a produção de fotoassimilados e, conseqüentemente, o crescimento da planta.

A inibição do crescimento de plantas de cevada, trigo, algodão e tremoço, sob salinidade, foi relacionada à menor taxa de expansão foliar (Munns *et al.*, 1986), pois essa leva à redução na fotossíntese (McCree, 1986; Marcellis *et al.*, 1999; Zhu, 2001; Netondo *et al.*, 2004). Por outro lado, o menor crescimento foliar pode representar uma resposta adaptativa ao estresse salino, visto que pode prolongar a sobrevivência da planta por reduzir a taxa de transpiração (Silva *et al.*, 2008).

O crescimento da raiz é considerado uma adaptação morfológica importante sob estresses hídrico e salino, pois possibilita o aumento da área de absorção de água e nutrientes, prevenindo a deficiência mineral e a desidratação (Okuzanya, 1977; Creelman *et al.*, 1990; Saab *et al.*, 1990). Em plantas de milho sob estresse salino foi observado aumento da razão raiz/parte aérea (Lohauss *et al.*, 2000).

1.2 Efeito da salinidade na fixação de nitrogênio e em processos de economia desse nutriente

O N é o elemento mineral mais limitante ao crescimento das plantas (Willians *et al.*, 2001). As fontes desse nutriente no solo são principalmente

compostos orgânicos em decomposição, fertilizantes e o nitrogênio atmosférico fixado biologicamente.

Os solos salinos são inadequados para o cultivo de plantas devido à indisponibilidade do N mineral, visto que a aquisição desse elemento pelas plantas pode ser afetada pela competição entre o cloro e o nitrato (Zahran, 1999). A salinidade pode também interferir na utilização do N, influenciando várias etapas do metabolismo desse elemento, reduzindo a síntese de proteína e afetando assim o crescimento da planta (Frechill *et al.*, 2001; Aragão *et al.*, 2010, 2011).

Alguns grupos de bactérias conseguem fixar nitrogênio quando associadas simbioticamente a plantas, pois possuem um complexo enzimático, a dinitrogenase, capaz de quebrar a tripla ligação do N gasoso (N_2) e fixá-lo em NH_4 , que é uma forma assimilável pelas plantas. Em leguminosas, a produção de biomassa e a concentração de compostos nitrogenados estão diretamente relacionadas à quantidade de N_2 fixado por bactérias da família *Rhizobiaceae*, denominadas comumente de rizóbios, que são capazes de infectar as raízes dessas plantas, promovendo a formação de nódulos, onde ocorre a redução do N_2 em NH_4 (Nandwal *et al.*, 2000). O NH_4 formado é transferido para o citosol da planta hospedeira, incorporado em diversas formas de N orgânico e essas transportadas para a parte aérea da planta (Kennedy *et al.*, 1975).

A presença de nódulos em raízes de leguminosas é um indicativo de que essas plantas possuem uma fonte de N diferente da existente na fração mineral do solo (Hungria e Araújo, 1994). Contudo, sob condições de estresse, certos sistemas simbióticos tornam-se ineficientes e pode ocorrer também diminuição da nodulação, reduzindo assim a fixação de N_2 (Khadri *et al.*, 2001; Bouhmouch *et al.*,

2005). Assim, é necessário saber se esses nódulos são funcionais e, portanto, se estão contribuindo para o suprimento de N da planta (Garg e Chandel, 2011).

O estresse salino afeta a fixação de N₂ de diversas formas: pode inibir a absorção de cálcio pela planta, reduzindo o crescimento das raízes e dos pelos radiculares, afetando o desenvolvimento inicial dos nódulos e diminuindo o potencial de infecção da bactéria (Tavares *et al.*, 2011) ou pode ainda reduzir a atividade da nitrogenase em diversas leguminosas cultivadas nessa condição, como feijão (Ferri *et al.*, 2000; Khadri *et al.*, 2001; Freire e Rodrigues, 2009).

Conforme mencionado acima, a salinidade afeta a fertilidade do solo (Zahran, 1999). Plantas submetidas à salinidade tiveram redução dos teores de N em suas folhas (Meloni *et al.*, 2004). Há duas estratégias importantes para a economia de nutrientes nas plantas em solos pouco férteis: eficiência do uso de nutrientes e a proficiência de reaproveitamento de nutrientes (Vitousek, 1984; Killingbeck, 1996; Covelo e Gallardo, 2002; Distel *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2006^a). Essa última é definida como a concentração mínima de nutrientes nas folhas senescentes, antes da abscisão (Killingbeck, 1996). Assim, quanto menor a concentração de um nutriente nas folhas senescentes, maior é a proficiência de reaproveitamento do mesmo. A remoção de um nutriente das folhas senescentes implica no seu direcionamento para outros tecidos (May e Killingbeck 1992; Pugnaire e Chapin 1993), representando uma economia do mesmo para a planta.

A eficiência no uso de nutrientes é definida como a razão entre a biomassa produzida pela planta e a concentração de nutrientes presentes em suas folhas. Representa a capacidade que a planta tem em converter o nutriente

absorvido em biomassa (Föhse *et al.*, 1988). É vista, também, como um mecanismo de adaptação importante a ambientes pouco férteis (Covelo e Gallardo, 2002). A eficiência no uso de nutrientes tende a aumentar com o decréscimo de nutrientes no solo (Distel *et al.*, 2003), conforme observado para a eficiência de uso de nitrogênio (Debez *et al.*, 2006), potássio e cálcio (Debez *et al.*, 2008) em plantas de *Cakile marítima*, cultivadas com concentrações crescentes de NaCl.

1.3 Brassinosteróides.

Os brassinosteróides são hormônios importantes para o controle do desenvolvimento de plantas (Fujioka *et al.*, 2003). O primeiro brassinosteróide foi isolado do pólen de *Brassica napus* (Grove *et al.*, 1979). Após essa data, foram identificados brassinosteróides em outros órgãos vegetais (Sasse, 1997; Fujioka *et al.*, 2003). Os brassinosteróides têm sido descritos, em monocotiledôneas e dicotiledôneas, bem como em algas, briófitas, pteridófitas e gimnospermas (Fujioka *et al.*, 1996; Vardhini *et al.*, 2006; Bajguaz, 2009), ocorrendo em maior concentração em tecidos jovens que em tecidos adultos (Mandava, 1988). Esses hormônios regulam os processos de alongamento celular, diferenciação do xilema (Bajguaz *et al.*, 2003), alongamento de raízes e caules, germinação de sementes, dominância apical e expansão foliar (Grove *et al.*, 1979). Algumas pesquisas apontam que existe interação entre brassinosteróides e auxinas, sendo assim, esses dois hormônios modulariam a expressão de genes envolvidos nos mesmos processos fisiológicos (Nemhauser *et al.*, 2004).

Trabalhos com inibidores de brassinosteróides, como o brassinazole, resultaram em nanismo em agrião e a aplicação exógena do hormônio restaurou o crescimento normal da planta, indicando a necessidade do hormônio para seu desenvolvimento normal (Asami *et al.*, 2000).

Dentre os efeitos mais marcantes dos brassinosteróides está o aumento da resistência das plantas a diferentes situações de estresse (Sairam, 1994; Zullo e Adam, 2002; Bajguaz, 2003), como o estresse salino (Saíram, 1994; Anuradha *et al.*, 2003). Aplicações do hormônio em raízes diminuíram o efeito inibitório do NaCl no crescimento de feijão-mungo (Amzallag e Goloubinoff, 2003), de plantas de amendoim (Vardhini e Rao, 1997) e de arroz (Anuradha e Rao, 2001; 2003; Ozdemir *et al.*, 2004). Segundo Anuradha e Rao (2003) em plantas de arroz, aplicação de brassinosteróide compensou os efeitos inibitórios do NaCl sobre os teores de pigmentos fotossintéticos e isso resultou no estímulo do crescimento das plantas sob estresse salino. Os teores de carotenóides também foram aumentados em plantas de tomate tratadas com brassinosteróides (Behnamnia *et al.*, 2009).

Foi verificado que o uso de brassinosteróides inibe a degradação oxidativa de lipídios, diminuindo os teores de malondialdeído (produto da peroxidação de lipídios), agindo assim como um protetor de membrana (Ershova e Khripach, 1996).

Alguns estudos indicam que os brassinosteróides têm ação também na fixação de N₂ (Khripach *et al.*, 1999; Anuradha e Rao, 2001). Segundo Terakado *et al.*, (2005), esses hormônios estão envolvidos no controle da organogênese dos nódulos. Mutantes de plantas de ervilha deficientes em brassinosteróides

apresentaram redução na formação de nódulos e enxertos das raízes de plantas mutantes com caules de plantas do tipo selvagem restabeleceram o número de nódulos, indicando que os brassinosteróides transportados dos indivíduos do tipo selvagem promoveram a nodulação no sistema radicular dos indivíduos mutantes (Ferguson *et al.*, 2005). Aplicações de brassinosteróides também aumentaram o número de nódulos e a atividade da nitrogenase em raízes de feijoeiro (Upreti e Murti, 2004).

Há indicações de que os brassinosteróides reduzem os efeitos inibitórios do NaCl no metabolismo das proteínas (Anuradha e Rao, 2001), por estimular a síntese de ácidos nucleicos (Vardhini *et al.*, 2012). O aumento do teor protéico em plantas de arroz, cultivadas sob salinidade, foi associado ao maior crescimento observado após aplicação do hormônio (Anuradha e Rao, 2001; Ozdemir *et al.*, 2004). Aplicações de brassinosteróides também levaram a aumentos nos teores de proteínas solúveis em leguminosas (Vardhini e Rao, 1997; Fariduddin *et al.*, 2004).

Embora os brassinosteróides estejam implicados no controle da fixação de N₂ e no metabolismo de compostos nitrogenados, não há dados na literatura sobre os efeitos desses hormônios nos mecanismos de conservação de N.

1.4 Descrição da planta

Cajanus cajan é uma leguminosa, conhecida popularmente como feijão-guandu, guandu, quando, anduzeiro, guandeiro, ervilha-de-angola, ervilha-de-árvore, ervilha-de-sete-anos, ervilha-do-congo, feijão-de-árvore, feijão-do-congo, feijão-quando e tantaraga (Houaiss e Villar, 2004). O guandu pertence à família

Leguminosae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae e subtribo Cajanine, (Maesen, 1980). As plantas são arbustivas e perenes, podendo ser cultivadas como anuais. Seu ciclo de vida varia entre 150 e 360 dias (Santos *et al.*, 1996). É um legume amplamente cultivado em países tropicais e subtropicais (Summerfield e Roberts, 1985 *apud* Akintayo *et al.*, 1999), pois, mesmo em solos degradados ou com baixas concentrações de nutrientes, pode produzir sementes ricas em proteínas (Sheldrake e Narayanan, 1979), estando adaptado a altas temperaturas e a um amplo gradiente de umidade (Mitidieri, 1993), inclusive a condições de seca (Wutke, 1987 *apud* Giomo *et al.*, 2001). É também tolerante à acidez do solo e capaz de solubilizar fosfatos insolúveis, tornando-os disponíveis à planta (Ae *et al.*, 1990).

Os países asiáticos são os principais produtores mundiais de guandu, que teve sua origem na Índia, sendo que esse país é um produtor potencial dessa leguminosa (FAO, 1997). No Brasil, foi introduzido principalmente por alguns genótipos serem resistentes à seca, podendo crescer em solos pobres em nutrientes (Keating e Fisher, 1985; Alves e Medeiros, 1997). Desenvolve-se bem neste tipo de solo por ter um sistema radicular profundo e amplamente ramificado, capaz de resistir ao estresse hídrico (Nene e Sheila, 1990). Em suas raízes pode haver associações simbióticas tanto com bactérias fixadoras de N₂ (White *et al.*, 1953), com conseqüente formação de nódulos radiculares, como com fungos micorrízicos arbusculares (Garg e Chandel, 2011). As folhas de guandu podem conter grandes quantidades de N, que variam de 3,2 g/kg em folhas verde-maduras a 1,6 g/kg em folhas senescentes (Skala *et al.*, 2000). Compõe pastos

sempre verdes em tempos de seca, e pode ser utilizado também como adubo verde (Wutke, 1987) e na rotação de culturas (Alves e Medeiros, 1997).

Em trabalhos que avaliam o efeito do estresse salino no crescimento de plantas de *C. cajan* não noduladas foi verificado que a presença de NaCl levou a reduções em diversos parâmetros, como: altura da parte aérea, área foliar, índice de área foliar, taxa de crescimento da cultura, taxa de crescimento relativo, taxa de assimilação líquida e produtividade (Ashraf, 1994; Dalio *et al.*, 2011).

2. Objetivo

Avaliar a influência da aplicação de brassinosteróide no metabolismo do nitrogênio e no crescimento de plantas de *C. cajan* noduladas e sob condições de estresse salino.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foi realizado um experimento, em casa de vegetação, com delineamento experimental completamente casualizado, em esquema fatorial 3 X 2. Os tratamentos consistiram em três concentrações de NaCl (0; 100 e 200 mM) e aplicação ou não de brassinosteróide. O experimento foi dividido em duas etapas (90 e 180 dias após a semeadura), utilizando-se 12 repetições para cada etapa.

3.2 Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi realizado em casa de vegetação no Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP, com coordenadas geográficas 22°49'45''S, 47°06'33''W e altitude média de 670 metros, no período de março a setembro de 2009, sob luz natural e temperaturas que variaram entre 15 °C e 35 °C.

Foram utilizadas sementes de *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (feijão guandu) coletadas de plantas cultivadas na área experimental do Departamento de Biologia Vegetal.

As sementes foram mantidas em água destilada por 6 horas, em temperatura ambiente, sem aeração, e depois embebidas em uma suspensão de rizóbios de crescimento lento, crescidos em meio líquido para rizóbios YMB (Yeast manitol broth) (Vicent 1970). Esses rizóbios, isolados de nódulos de plantas de *C. cajan* cultivadas em canteiro da área experimental do Departamento de Biologia Vegetal, foram obtidos da coleção do Departamento de Biologia Vegetal, da Unicamp. Logo a seguir, as sementes foram semeadas em copos plásticos com

capacidade para 700 mL, contendo perlita. Foram colocadas cinco sementes por copo e treze dias depois foi realizado um desbaste, deixando apenas uma planta por copo. As plantas foram irrigadas diariamente com água de torneira, até a queda dos cotilédones (entre 8 e 11 dias). Depois da queda dos cotilédones as plantas passaram a receber semanalmente 150 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1939), sem nitrogênio, com ou sem adição de NaCl.

Após o aparecimento das primeiras folhas trifolioladas foram adicionados novamente 2 mL de suspensão de rizóbio por copo.

3.3 Caracterização das folhas

O experimento foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, o comprimento do limbo de folhas de *C. cajan*, previamente marcadas com barbante no pecíolo, foi medido diariamente até que o crescimento se estabilizasse. Só então as folhas foram coletadas, já que a partir dessa fase a retirada de nutrientes da folha poderia se iniciar (Lima *et al.*, 2006a). Essas folhas foram chamadas de verde-maduras e essa etapa do experimento teve duração de 90 dias. Na segunda etapa do experimento, folhas previamente marcadas com barbante, no pecíolo, foram coletadas no fim da senescência, quando abscidaram após serem tocadas. Essa etapa do experimento durou cerca de 180 dias após a semeadura. As folhas coletadas nas duas etapas do experimento foram colocadas em N líquido e depois conservadas a -20°C . Posteriormente, foram liofilizadas e utilizadas para análises bioquímicas, sendo que as folhas abscidadas foram utilizadas especificamente para análises de proficiência de reaproveitamento de nitrogênio.

3.4 Exposição das plantas ao NaCl e ao brassinosteróide

A solução nutritiva com NaCl foi adicionada, pela primeira vez, às plantas uma semana depois da queda dos cotilédones.

Para evitar o choque osmótico, as concentrações de NaCl foram aumentadas gradativamente, a cada dois dias, em 50 mM (150 mL/copo), até que atingissem as concentrações finais de 100 e 200 mM. O pH das soluções foi ajustado para que fosse mantido entre 6,8 e 7,2.

A exposição uniforme das raízes ao NaCl foi assegurada pelo encaixe do copo com furos na base, contendo a planta, dentro de outro copo de menor altura e maior diâmetro, sem furos. Dessa forma, após o acréscimo da solução, o excedente permanecia no copo externo por um período, possibilitando um contato mais prolongado entre a planta e a solução, que podia subir aos locais não umedecidos da perlita.

Entre uma aplicação e outra da solução nutritiva, acrescida ou não de NaCl, os copos internos foram lavados exaustivamente com água de torneira, para evitar o acúmulo do NaCl, e posteriormente foram deixados por 24 h escorrendo, para evitar diluição da solução nutritiva acrescida de NaCl, posteriormente aplicada.

O 24-epibrassinolideo (uma forma ativa de brassinosteróide) (Adam *et.al.*, 1986), adquirido da Sigma, foi dissolvido em etanol (1mg/mL), diluído em solução nutritiva até a concentração de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e aplicado uma semana antes da primeira aplicação de sal, uma vez que a aplicação de sal concomitante poderia comprometer a absorção do hormônio pelas raízes.

No experimento de proficiência de reaproveitamento de nitrogênio, que teve 180 dias de duração, foi feita uma reaplicação do hormônio, a fim de que uma possível degradação do mesmo não fosse confundida com a falta de efeito do hormônio nos mecanismos de conservação de N.

3.5 Medidas de crescimento

Aos 90 dias após a semeadura, foram tomadas oito plantas de cada tratamento para caracterização do crescimento. Foram realizadas as medidas de altura da parte aérea, do colo da planta até a gema apical e o comprimento da raiz principal do colo à coifa da mesma. As plantas foram, então, separadas em lâminas foliares, caule + pecíolos, raízes e nódulos. A seguir, foram obtidas as massas frescas (balança analítica Marte, modelo AL500) e realizada a determinação da área total das lâminas foliares (medidor LI-COR, modelo LI-3100). Logo após, o material foi colocado em estufa a 60°C, por 72 horas, para determinação das massas secas (balança analítica Marte, modelo AL500). O teor de umidade foi calculado a partir da diferença entre massa fresca e massa seca de folhas, raízes e nódulos.

Ao longo da segunda etapa do experimento (época em que ocorria abscisão foliar) foram feitas algumas observações da longevidade foliar. Contudo, as idades das folhas abscidadas não foram anotadas levando-se em consideração cada repetição, o que impossibilitou a análise estatística. Assim, os dados são apenas confiáveis quanto ao tratamento e foram incluídos na tese como dados qualitativos, porque dão uma indicação importante do efeito do estresse salino e do hormônio sobre a longevidade foliar.

3.6 Avaliações dos parâmetros bioquímicos

3.6.1 Dosagem de proteínas nas folhas

Para análise de proteínas totais em folhas, foram utilizados 100 mg de folhas verde maduras liofilizadas. As folhas liofilizadas foram maceradas em nitrogênio líquido. O material foi colocado em frascos âmbar com 4 mL de Na(OH) a 0,1N, onde foi mantido por 24h. Após, o extrato foi centrifugado a 1200 g, durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteínas, segundo o método estabelecido por Bradford (1976). A leitura das absorbâncias foi obtida em 595 nm, em espectrofotômetro 600 da marca FEMTO, modelo 600.

3.6.2 Dosagem de aminoácidos livres totais nas folhas

Para análise de aminoácidos livres totais, foram preparados extratos com 50 mg de folhas liofilizadas em MCW (metanol: clorofórmio: água; 12:5:3; v/v/v). A determinação foi feita segundo o método de Cocking e Yemm (1954), por reação colorimétrica com ninhidrina.

3.6.3 Dosagem de malondialdeído

A peroxidação lipídica nas folhas verde maduras foi verificada pela reação do ácido tiobarbitúrico, que determina a concentração de malondialdeído (um dos subprodutos da peroxidação de lipídios), segundo Heath e Packer (1968).

O material vegetal foi coletado, conservado em nitrogênio líquido e, depois, congelado e mantido em freezer até posterior liofilização. Foram

macerados 150 mg de cada amostra de folhas liofilizadas em 5mL de ácido tricloroacético a 0,1%, contendo 20% de polivinilpirrolidona. Após a total homogeneização, o extrato foi centrifugado a 10000 g por 5 minutos. Foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico, em 0,5 mL de sobrenadante. A mistura foi mantida por 30 minutos em banho maria a 95°C e seu posterior resfriamento foi feito em gelo. Para separar os resíduos e clarear a amostra, essa foi centrifugada a 10 000 g por 10 minutos. As absorbâncias foram medidas em 600 nm e subtraídas dos resultados da leitura das absorbâncias em 535 nm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Pharmacia Biotech Ultraspec 100. O cálculo do teor de malondialdeído foi determinado de acordo com a fórmula:

$$C = (\text{Abs } 535 - \text{Abs } 600) / E.b = \text{mmol de malondialdeído.g}^{-1} \text{ de massa seca}$$

Onde:

C – concentração de malondialdeído

b – caminho óptico (cm)

E – coeficiente de extinção molar = 155 mM^{-1}

3.6.4 Determinação de nitrogênio total e cálculos dos mecanismos de conservação de nitrogênio (proficiência de reaproveitamento e eficiência do uso de nitrogênio)

O N foi extraído de amostras de 50 mg de massa seca de folhas verde-maduras e senescentes pelo método de Kjeldahl, de acordo com Nelson e Sommers (1973). A concentração de N nas folhas abscidadas foi utilizada como

indicador da proficiência de reaproveitamento de nitrogênio, de forma que quanto maior a quantidade de N nas folhas abscidadas, menor a proficiência do reaproveitamento da planta (Killingbeck, 1996).

A eficiência do uso de nitrogênio, que avalia a produção de biomassa por unidade de N mineral, foi calculada pela razão MS/N, onde: MS = massa seca de folhas verde-maduras e N = concentração de N total de folhas verde-maduras (Chabot e Hicks, 1982).

3.6.5 Atividade específica da nitrogenase

Para avaliar se os nódulos estavam ativos ou não quanto à fixação de N₂, foi realizada a determinação *in vivo* da atividade específica da nitrogenase, utilizando-se a técnica de redução de acetileno a etileno, por cromatografia gasosa (Hardy *et al.*, 1968). Os sistemas radiculares foram removidos, lavados e imediatamente acondicionados em frascos de vidro de aproximadamente 250 mL, os quais foram vedados com tampas de borracha. Em seguida foram introduzidos 25 mL de acetileno nos frascos, com o auxílio de uma seringa. Após 15 minutos, tempo estabelecido a partir de testes prévios, alíquotas de 0,5 mL de gás foram retiradas dos frascos e injetadas em cromatógrafo a gás para avaliar a atividade da nitrogenase na conversão de acetileno a etileno. A atividade da enzima foi determinada pela quantidade de etileno produzido, utilizando-se um padrão de etileno como referência, e foi expressa em $\mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, por grama de massa da matéria fresca (MF) de nódulos ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

3.6.6 Dosagem de pigmentos fotossintéticos

Foram coletados 5 discos foliares ($0,75 \text{ cm}^2/\text{disco}$), os quais foram imersos em 5 mL de DMSO, em tubos escuros e vedados. Os tubos foram deixados em bancada por um período de 24 horas. Posteriormente, foram determinadas as leituras da densidade ótica a 470, 663 e 645 nm Hiscox e Israelstam (1979). Os teores de clorofila e de carotenóides foram expressos em mg.g^{-1} MS, e calculados de acordo com as equações de Lichtenthaler (1987).

4. Análise estatística dos dados

Os resultados foram submetidos à análise de variância para dois fatores (Two Way, ANOVA). Nos casos em que houve interação significativa dos dois fatores (hormônio e sal), os dados foram submetidos à análise de variância simples (One Way). Deste modo foi possível analisar conjuntamente os efeitos das aplicações de NaCl e 24-epi-brassinolídeo. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos da salinidade na longevidade foliar

Os efeitos da salinidade e do 24-epibrassinolídeo na longevidade foliar de *C. cajan* estão representados na tabela 1. Nos tratamentos salinos, na ausência de hormônio, verificou-se que à medida que a concentração de NaCl aumenta, a longevidade foliar diminui. Comparando-se os tratamentos hormonais, verificou-se que, sob salinidade, o brassinosteróide aumentou a longevidade foliar, nas plantas dos tratamentos sob estresse salino.

Tabela 1 – Longevidade foliar de plantas de *Cajanus cajan*, cultivadas sob concentrações diferentes de NaCl, na presença (+Br) ou ausência (-Br) de 24-epibrassinolídeo (Br).

	Concentração de NaCl (mM)					
	0		100		200	
Tratamento	-Br	+Br	-Br	+Br	-Br	+Br
Idade (dias)	152	143	123	150	120	130

5.2 Interação entre hormônio e salinidade

As tabelas 3 e 4 apresentam interações entre os efeitos das aplicações de 24-epibrassinolídeo e NaCl nos parâmetros de crescimento e bioquímicos, respectivamente. Houve interação significativa em relação aos efeitos causados pelas aplicações de hormônio e NaCl em apenas alguns dos parâmetros avaliados.

Dos 16 parâmetros avaliados, somente os teores de umidade de caules, folhas e nódulos apresentaram interação significativa entre 24-epibrassinolídeo e NaCl (Tabela 2).

Dos parâmetros bioquímicos avaliados, apenas três apresentaram interação significativa entre hormônio e NaCl. Foram verificadas interações significativas entre a presença de 24-epibrassinolídeo e NaCl apenas para os teores de clorofila *b*, total e carotenóides (Tabela 3).

Tabela 2 – Análise de variância para verificação de existência de interação entre os resultados das aplicações de 24-epibrassinolídeo e NaCl em parâmetros de crescimento de plantas de *Cajanus cajan*.

Interação entre concentração de brassinosteróide X concentração de NaCl Parâmetros de crescimento	
Comprimento da parte aérea	NS
Comprimento da maior raiz	NS
Massa fresca das raízes	NS
Massa fresca do caule	NS
Massa fresca das folhas	NS
Massa seca das raízes	NS
Massa seca do caule	NS
Massa seca das folhas	NS
Massa fresca de nódulos radiculares	NS
Massa seca de nódulos radiculares	NS
Número de nódulos	NS
Área foliar	NS
Teor de umidade das raízes	NS
Teor de umidade do caule	4,95*
Teor de umidade das folhas	4,09*
Teor de umidade dos nódulos	5,93**

Números seguidos de asteriscos mostram o valor de F e o nível de significância: *5%, **1%,
NS: interação não significativa.

Tabela 3 – Análise de variância para verificação de existência de interação entre os resultados das aplicações de 24-epibrassinolídeo e NaCl em parâmetros bioquímicos de plantas de *Cajanus cajan*.

Interação entre a concentração de brassinosteróide X concentração de NaCl Parâmetros bioquímicos	
Clorofila <i>a</i>	NS
Clorofila <i>b</i>	8,05***
Clorofila total	4,03*
Carotenóides	21,06***
Nitrogênio total folhas verde-maduras	NS
Nitrogênio total folhas senescentes	NS
Aminoácidos livres	NS
Proteínas totais	NS
Atividade da nitrogenase	NS
Peroxidação lipídica (MDA)	NS

Números seguidos de asteriscos mostram o valor de F e o nível de significância: *5%, *** 0,1%.
NS: interação não significativa.

5.3 Efeitos do NaCl e do 24-epibrassinolídeo (Br) nos parâmetros de crescimento de plantas de *Cajanus cajan*

5.3.1 Análise de crescimento - Folhas

Não houve redução nas massas da matéria seca e fresca de folhas de plantas de *C. cajan* sob diferentes concentrações de NaCl. Comparando-se plantas na presença de hormônio (+Br) com plantas que não receberam hormônio

(-Br), dentro da mesma concentração de NaCl, verifica-se que não houve diferença entre os tratamentos (Figuras 1A e 1B).

Com o aumento da concentração de NaCl para 200 mM houve diminuição da área foliar em plantas de *C. cajan*, tanto na presença do brassinosteróide, como na sua ausência. Contudo, a presença do hormônio contribuiu para resultados significativamente maiores, em relação às plantas que não receberam 24-epibrassinolídeo, em todas as concentrações de NaCl (Figura 1C).

O teor de umidade nas folhas de *C. cajan* aumentou no tratamento com 200 Mm de NaCl, sendo que, quando se compara plantas não tratadas e plantas tratadas com o brassinostóroide na concentração de 200 Mm de NaCl, verifica-se que com hormônio houve aumento do teor de umidade na folhas (Figura 1D).

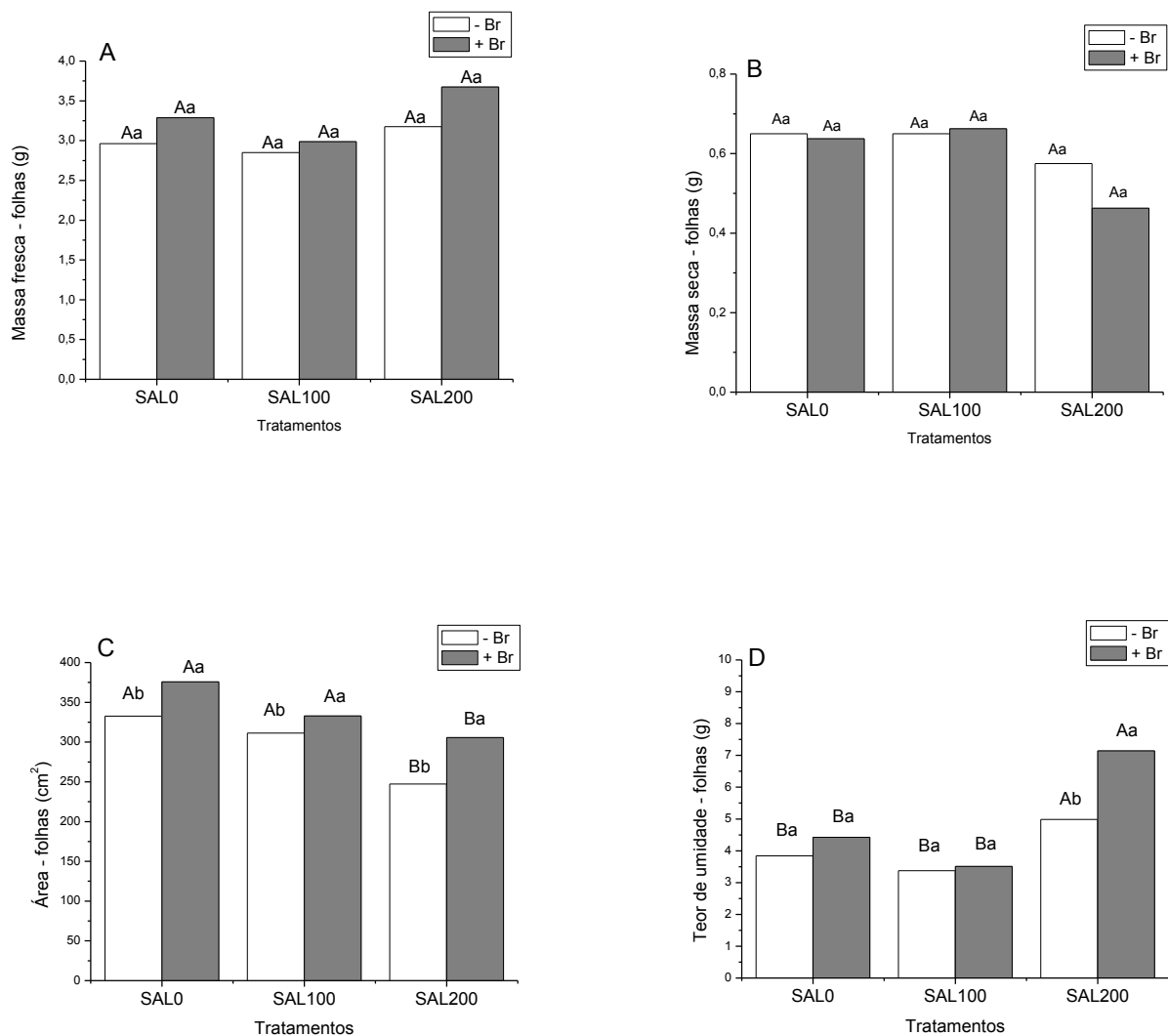


Figura 1 - Influência do 24-epibrassinolídeo (Br) e de NaCl, nas massas fresca (A) e seca (B), na área foliar (C) e no teor de umidade em folhas verde-maduras (D), de plantas de *Cajanus cajan*. Letras maiúsculas comparam tratamentos com diferentes concentrações de NaCl dentro de um mesmo tratamento hormonal e letras minúsculas comparam diferentes tratamentos hormonais dentro da mesma concentração de NaCl.

5.3.2 – Análise de crescimento - caule

A adição de NaCl na concentração de 200 Mm reduziu o comprimento do caule, em relação ao controle. A aplicação de brassinosteróide não amenizou os efeitos do NaCl (Figura 2A).

O teor de umidade do caule foi influenciado positivamente pela salinidade. O brassinosteróide influenciou no aumento desses teores, tanto em plantas controle como em plantas com 200 mM de NaCl (Figura 2B).

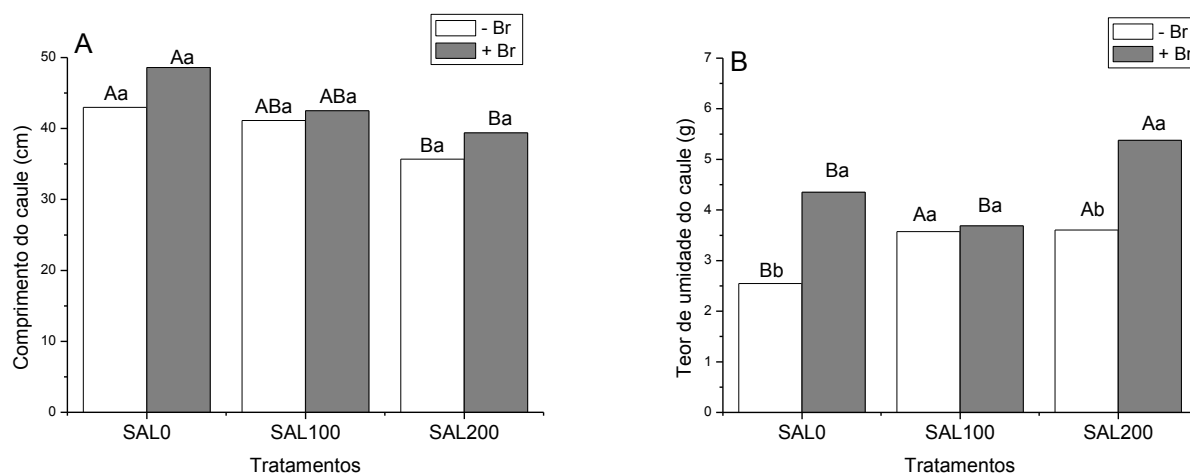


Figura 2 – Influência do 24-epibrassinolídeo (Br e de NaCl, no comprimento do caule (A) e no teor de umidade do caule (B) em plantas de *Cajanus cajan*. Letras maiúsculas comparam tratamentos com diferentes concentrações de NaCl dentro de um mesmo tratamento hormonal e letras minúsculas comparam diferentes tratamentos hormonais dentro da mesma concentração de NaCl .

5.3.3 – Análise de crescimento - raízes

A salinidade levou a aumentos nas massas fresca das raízes. Quando se compara plantas -Br e com +Br, na mesma concentração de NaCl, verifica-se que o brassinosteróide levou a aumentos nas massas fresca e seca das raízes (Figura 3A e 3B).

O comprimento das raízes das plantas tratadas com NaCl não diferiu do das plantas controle e a aplicação de brassinosteróide não influenciou o crescimento desse órgão (Figura 3C).

A salinidade afetou o teor de umidade da raiz, sendo que, com o uso de 100 mM NaCl houve aumento do teor de umidade. Não houve influência do brassinosteróide, quando se comparam plantas sem e com hormônio, sob salinidade ou não (Figura 3D).

5.3.4 – Análise de crescimento dos nódulos

O NaCl não afetou as massas fresca e seca dos nódulos radiculares. No entanto, quando se comparam tratamentos com e sem adição de 24-epibrassinolídeo verifica-se que com aplicação do hormônio houve aumento dessas massas (Figuras 4A e 4B).

O teor de umidade dos nódulos das plantas tratadas com NaCl não diferiu do das plantas controle. Em presença do NaCl houve aumento no teor de umidade em plantas -Br, somente no tratamento com 100 mM (Figura 4C).

O NaCl não influenciou o número de nódulos em plantas de *C. cajan*, mas quando se compara os tratamentos +Br e -Br, na mesma concentração de NaCl,

verifica-se que nos tratamentos com o brassinosteróide houve aumento no número de nódulos (Figura 4D).

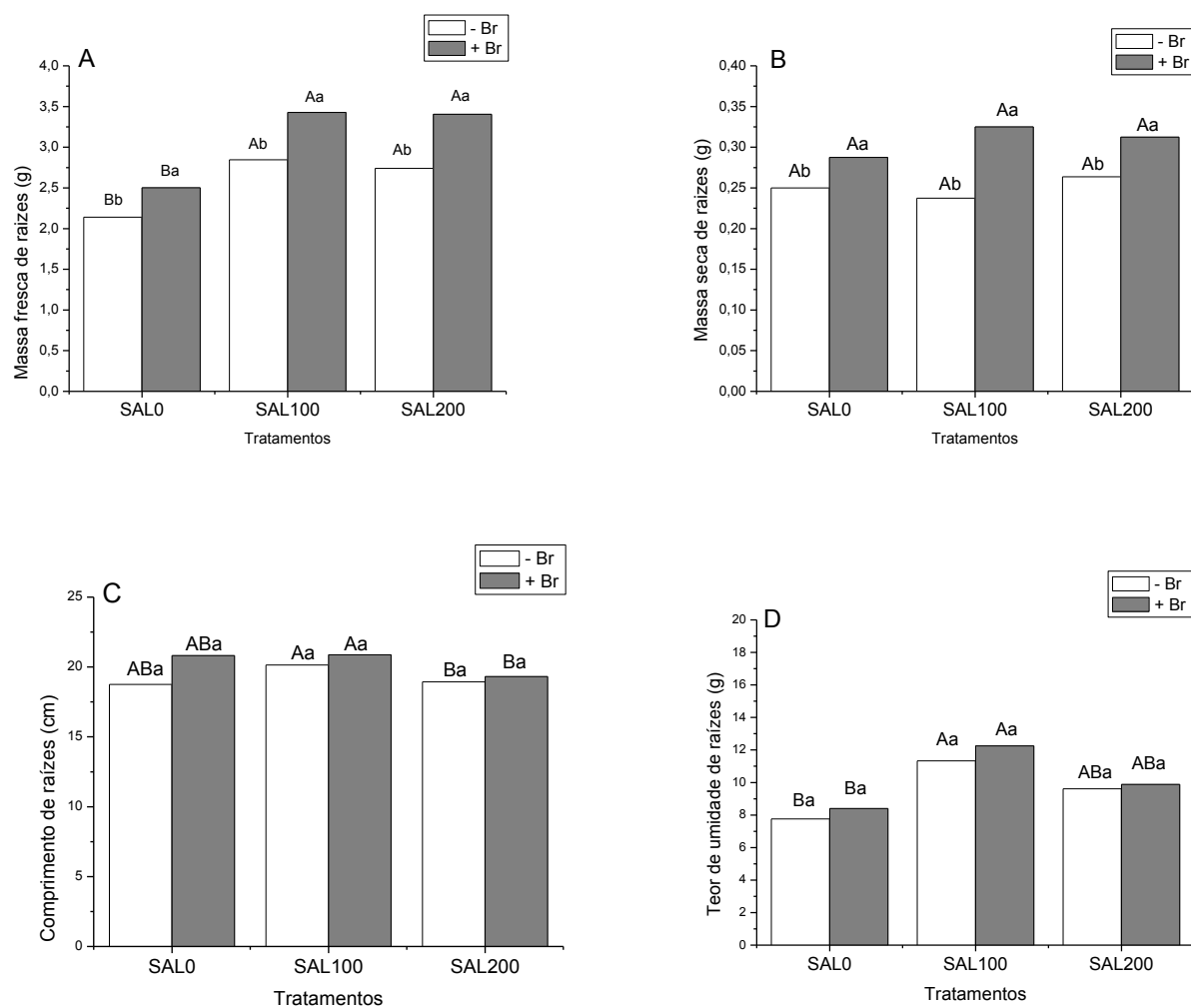


Figura 3 – Influência do 24-epibrassinolídeo (Br) e de NaCl nas massas fresca (A) e seca (B), no tamanho (C) e no teor de umidade de raízes (D) em plantas de *Cajanus cajan*. Letras maiúsculas comparam tratamentos com diferentes concentrações de NaCl dentro de um mesmo tratamento hormonal e letras minúsculas comparam diferentes tratamentos hormonais dentro da mesma concentração de NaCl.

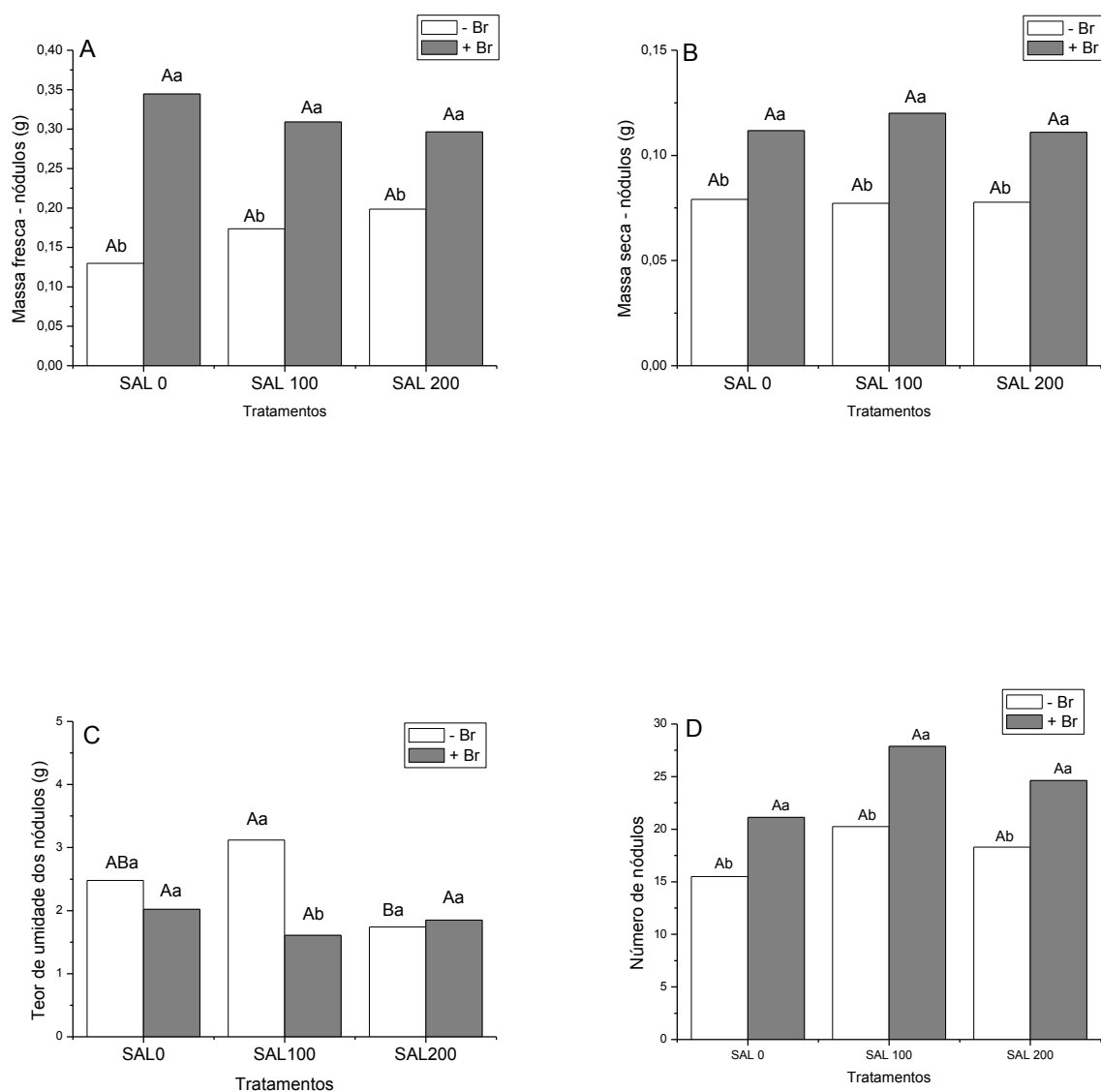


Figura 4 – Influência do 24-epibrassinolídeo (Br) e de NaCl, nas massa fresca (B) e seca (C), no teor de umidade (C) e no número de nódulos (D) em plantas de *Cajanus cajan*. Letras maiúsculas comparam tratamentos com diferentes concentrações de NaCl dentro de um mesmo tratamento hormonal e letras minúsculas comparam diferentes tratamentos hormonais dentro da mesma concentração de NaCl.

5.4 Efeitos da salinidade e do 24-epibrassinolídeo nos parâmetros bioquímicos em plantas de *Cajanus cajan*

5.4.1 - Pigmentos

A salinidade afetou os teores de clorofila *a*, *b* e total apenas no tratamento com 200 mM de NaCl. Nessa concentração houve aumento dos teores de clorofila *a* e total em plantas com adição do hormônio. A adição do brassinosteróide provocou redução na concentração de clorofila *b* nos tratamentos controle e 100 mM de NaCl, não tendo efeito significativo no tratamento com 200 mM de NaCl. (Figuras 5A, 5B e 5C).

No tratamento com 100 mM de NaCl, houve aumento dos teores de carotenóides, sendo que em 200 mM de NaCl as concentrações desses pigmentos assemelharam-se às do controle. O brassinosteróide não influenciou esses teores (Figura 5D).

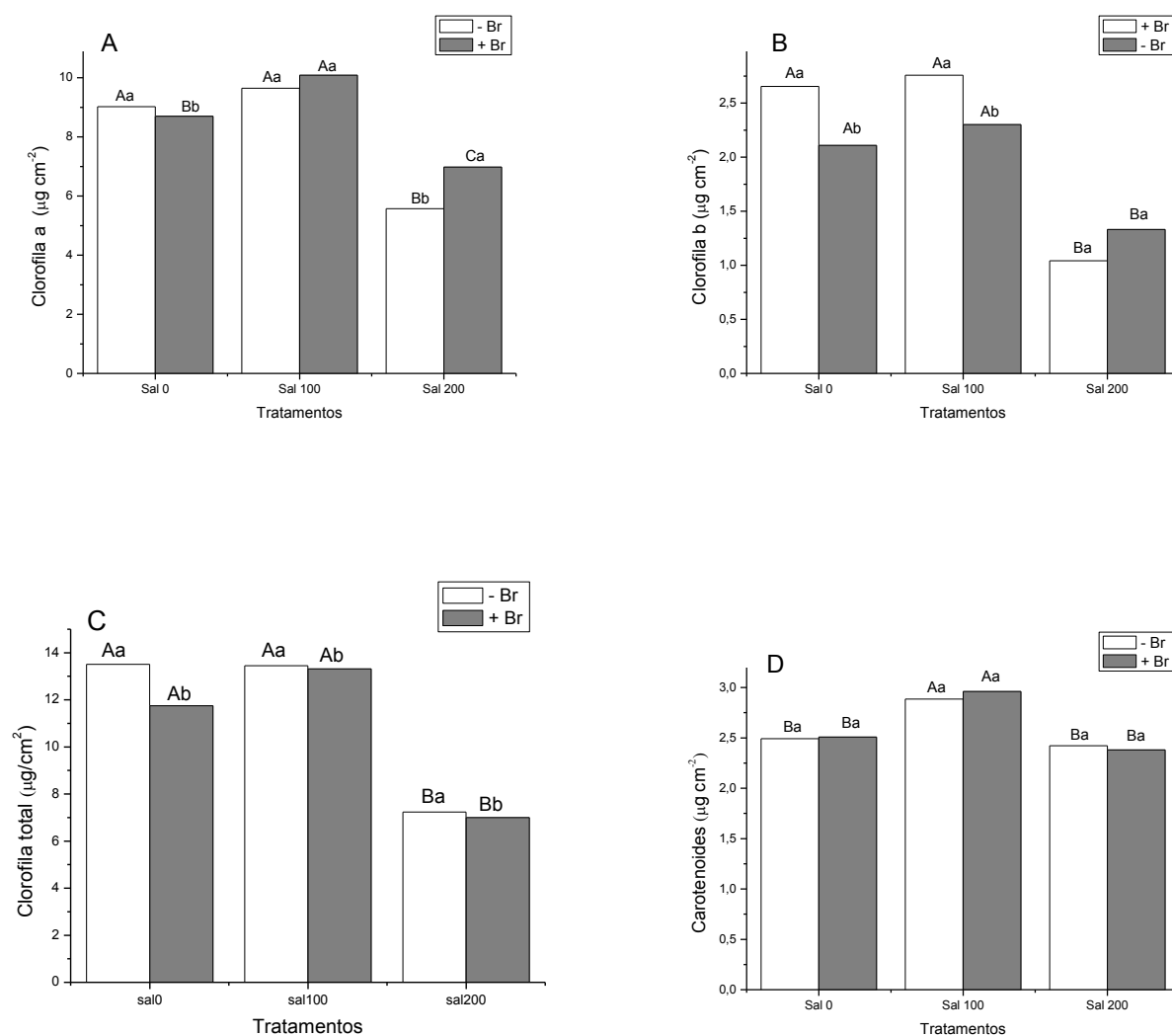


Figura 5 – Influência do 24-epibrassinolídeo (Br) e de NaCl, nos teores de clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total (C) e carotenóides totais (D) em plantas de *Cajanus cajan*. Letras maiúsculas comparam tratamentos com diferentes concentrações de NaCl dentro de um mesmo tratamento hormonal e letras minúsculas comparam diferentes tratamentos hormonais dentro da mesma concentração de NaCl.

5.4.2 Nitrogênio total e mecanismos de conservação de nitrogênio

O nitrogênio total em folhas verde-maduras diminuiu em plantas crescendo na concentração de 200 mM de NaCl, com ou sem aplicação de 24-epibrassinolídeo. Comparando-se os tratamentos hormonais na mesma concentração de NaCl, verifica-se que a aplicação do hormônio levou a aumentos na concentração de nitrogênio nessas folhas (Figura 6A).

A concentração de nitrogênio total em folhas senescentes aumentou sob salinidade (Figura 6B). Desta forma verifica-se que a salinidade levou a aumentos na perda de nitrogênio pela planta.

A eficiência do uso de nitrogênio aumentou com a salinidade, mas diminuiu com a aplicação do brassinosteróide, quando se compara plantas com e sem hormônio na mesma concentração de NaCl (Figura 6C).

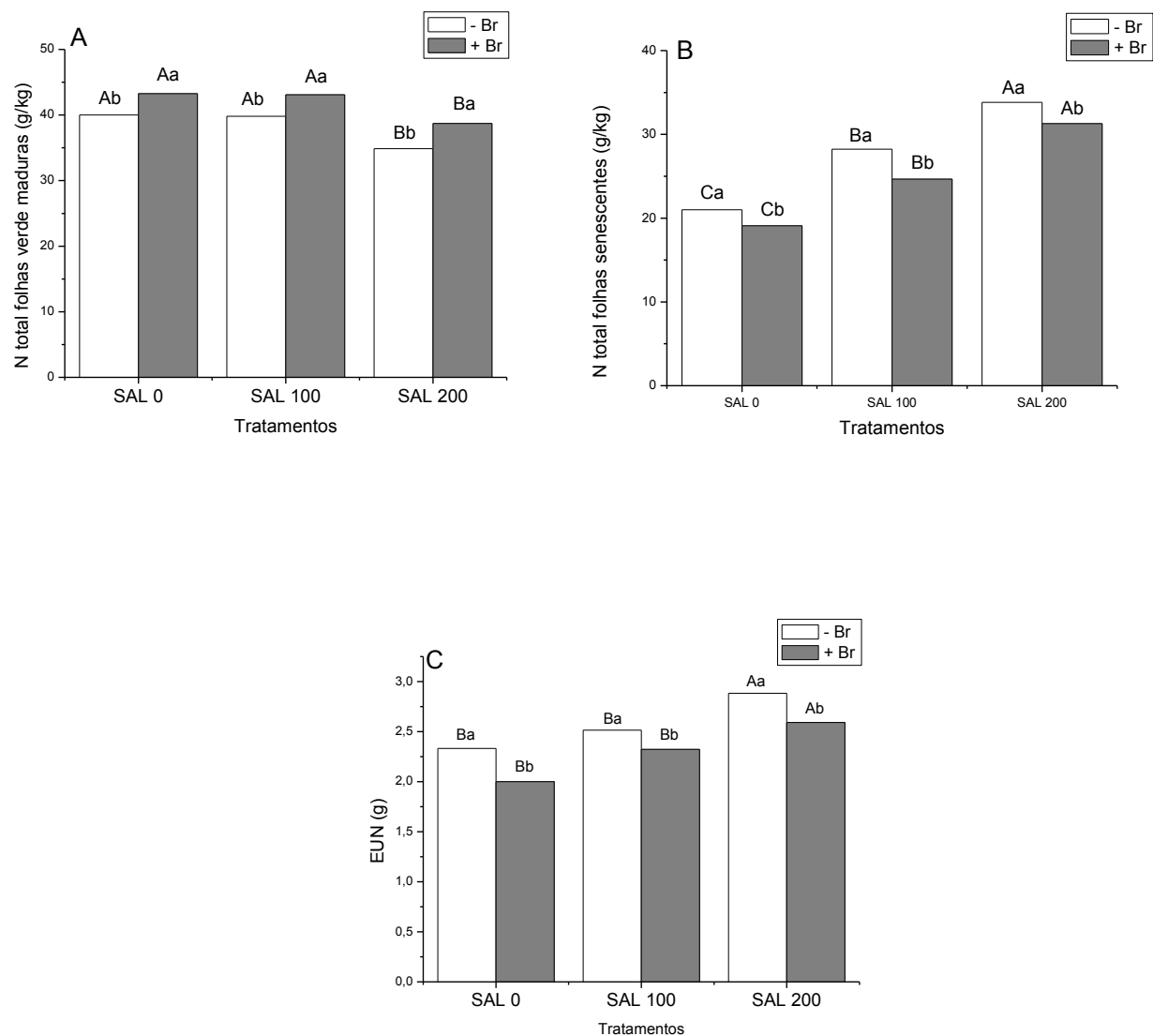


Figura 6 – Influência do 24-epibrassinolídeo (Br) e de NaCl, no teor de nitrogênio total em folhas verde-maduras (A), em folhas senescente (B) e eficiência no uso do nitrogênio (C) em plantas de *Cajanus cajan*. Letras maiúsculas comparam tratamentos com diferentes concentrações de NaCl dentro de um mesmo tratamento hormonal e letras minúsculas comparam diferentes tratamentos hormonais dentro da mesma concentração de NaCl.

5.4.3 Peroxidação de lipídios

Em plantas que não receberam aplicação hormonal houve aumento nos teores de MDA, com o aumento da salinidade para 200 mM. Contudo a adição do brassinosteróide não influenciou os teores de MDA, quando se compara plantas crescendo sob a mesma concentração de NaCl (Figura7).

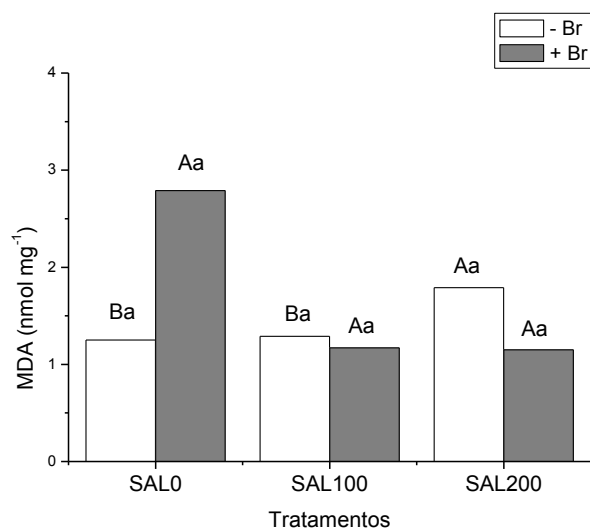


Figura 7- Influência do 24-epibrassinolídeo (Br) e de NaCl no teor de malondialdeído (MDA) em plantas de *Cajanus cajan*. Letras maiúsculas comparam tratamentos com diferentes concentrações de NaCl dentro de um mesmo tratamento hormonal e letras minúsculas comparam diferentes tratamentos hormonais dentro da mesma concentração de NaCl.

5.4.4 Atividade da nitrogenase, teores de aminoácidos livres totais e proteínas totais.

A atividade da nitrogenase em nódulos de plantas de *C. cajan* diminuiu nas duas concentrações de NaCl. Nos tratamentos com o brassinosteróide a atividade da enzima aumentou em relação às plantas não tratadas, sob a mesma concentração do NaCl (Figura 8A).

Os teores de aminoácidos totais foram influenciados significativamente pela salinidade, no tratamento com 200 mM de NaCl. A adição de brassinosteróide não influenciou nos teores de aminoácidos, quando se compara tratamentos na mesma concentração de NaCl (Figura 8B).

A salinidade não afetou os teores de proteínas totais presentes em folhas de *C. cajan*, sendo que a aplicação de brassinosteróide também não influenciou esses teores (Figura 8C).

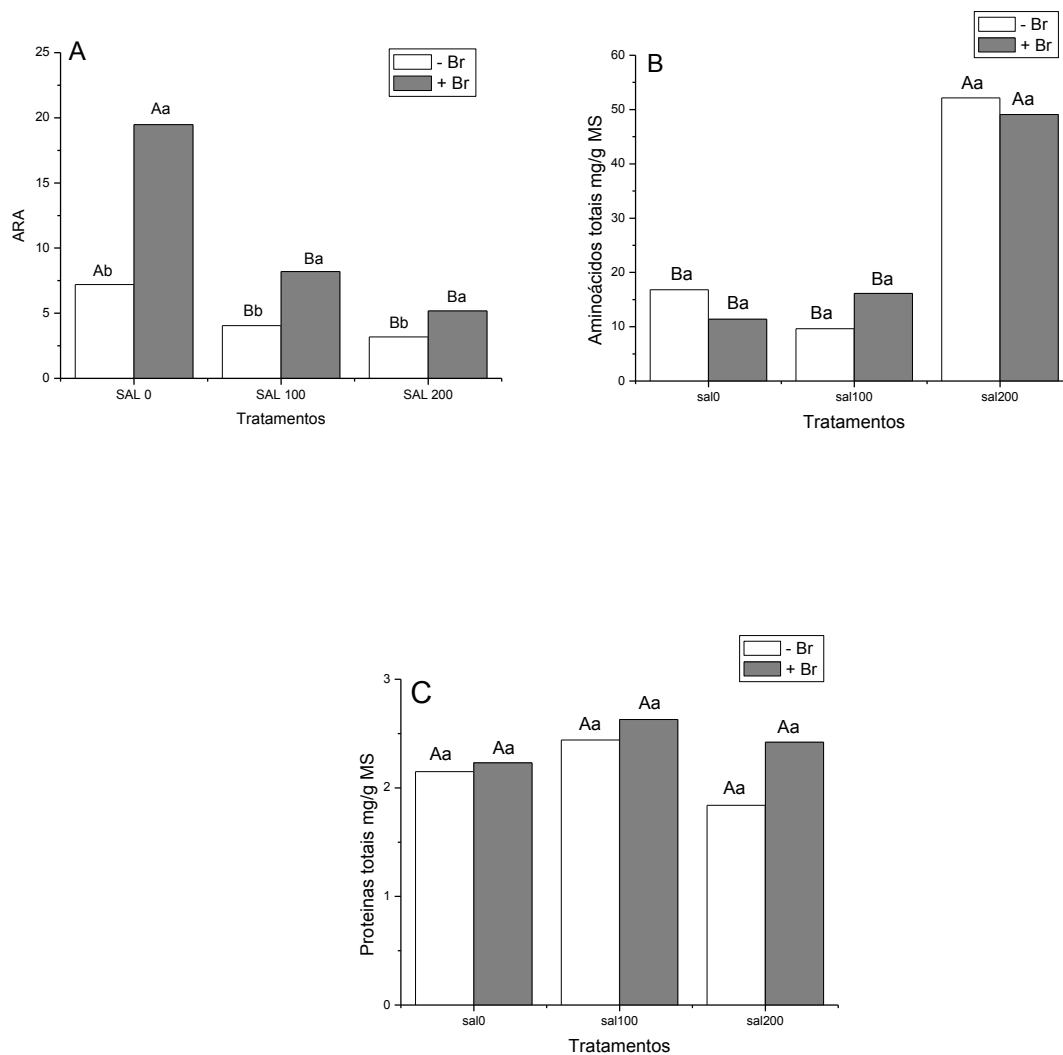


Figura 8 - Influência do 24-epibrassinolídeo (Br) e do NaCl, na atividade da nitrogenase em μmoles etileno g/h/MF de nódulos (ARA) em raízes (A), aminoácidos totais (B) e nos teores de proteínas totais (C) em folhas verde-maduras de *Cajanus cajan*. Letras maiúsculas comparam tratamentos com diferentes concentrações de NaCl dentro de um mesmo tratamento hormonal e letras minúsculas comparam diferentes tratamentos hormonais na mesma concentração de NaCl.

6. DISCUSSÃO

O teor de umidade em folhas, caules e raízes de *C. cajan* aumentou com o aumento da concentração de NaCl no meio de crescimento da planta. Esse acúmulo de água nas células pode estar relacionado com a adaptação da planta ao estresse salino (Costa *et al.*, 2003), reduzindo a concentração de sais no citoplasma (Ghoulam *et al.*, 2002), que poderia afetar o metabolismo da planta (Umezawa *et al.*, 2002; Carillo *et al.*, 2005).

Em solos a presença de NaCl diminui o seu potencial hídrico e isto afeta a absorção de água pelas raízes (Umezawa *et al.*, 2002; Carillo *et al.*, 2005., Munns *et al.*, 2006), reduzindo o crescimento da planta. Contudo, no presente estudo verificou-se que as massas fresca e seca de folhas não foram afetadas pelo NaCl e nem pelo brassinosteróide. Isto pode estar relacionado com o maior teor de umidade observado, indicando uma possível adaptação de *Cajanus cajan* à salinidade. Porém, sob estresse salino mais severo, essa capacidade de adaptação é diminuída, pois Dalio *et al.* (2007) observaram redução nesses parâmetros em plantas não noduladas de *C. cajan* cultivadas com NaCl a 400 mM.

Os efeitos nocivos do NaCl a espécies diversas foram demonstrados em vários estudos, principalmente no que diz respeito à diminuição da área foliar, pois, com a diminuição de absorção de água pelas plantas suas células contraem-se, impedindo a expansão celular, necessária ao aumento da área foliar (Munns *et al.*, 2006; Lacerda *et al.*, 2007). Como o excesso de sais leva à redução do potencial hídrico do solo, a redução da área foliar pode ser vista como uma resposta ao estresse hídrico, associado ao estresse salino, diminuindo desta

forma a perda de água por transpiração (Munns e Termaat, 1986; Silva *et al.*, 2008). No presente trabalho, com o aumento da concentração de NaCl houve diminuição da área foliar, em relação às plantas controle. A aplicação do brassinosteróide reverteu significativamente esse quadro levando as plantas sob estresse salino, mesmo sob 200 mM de NaCl a apresentarem área foliares maiores do que aquelas sem adição do brassinosteróide, indicando que possivelmente a aplicação do hormônio tenha induzindo respostas que reduziram o estresse das plantas sob excesso de salinidade. De fato, os teores de umidade das folhas e caule das plantas com adição de 24-epibrassinolídeo foram maiores do que nas plantas sem adição de brassinosteróide, crescendo sob 200 mM de NaCl. Isso está de acordo com as observações de Mandava (1988) e Nemhauser *et al.* (2004), que verificaram que os brassinosteróides estão envolvidos no alongamento e na expansão celular. É possível que o maior volume de água observado na parte aérea das plantas tratadas com o brassinosteróide, tenha sido devido ao efeito do hormônio sobre as aquaporinas, conforme sugerido por Morillon *et al.* (2001), que verificaram aumentos na permeabilidade de membranas celulares de *Arabidopsis thaliana* após aplicação desses hormônios.

O maior aporte de água à parte aérea das plantas de *C. cajan* tratadas com 24-epibrassinolídeo, sob salinidade, pode ser explicado pelo aumento no crescimento das raízes, evidenciado pela maior massa fresca desses órgãos, após tratamento hormonal. Sob estresse salino as plantas podem compensar o reduzido crescimento da raiz principal, pelo maior crescimento ou engrossamento de suas raízes laterais, amenizando assim os efeitos da deficiência hídrica, resultante do baixo potencial hídrico do solo, causado pelo NaCl (Tester e

Davenport, 2003). Essa deve ter sido também a causa do efeito promotor do brassinosteróide na massa fresca das raízes de *C. cajan*, já que não foram observados aumentos do comprimento da raiz principal de plantas tratadas com o hormônio. Além disso, foram observados aumentos na massa seca das raízes dessas plantas, após tratamento hormonal. Esse aumento de biomassa em plantas +Br pode indicar que houve uma maior produção de raízes laterais. Estudos morfológicos do sistema radicular de plantas tratadas com 24-epibrassinolídeo poderão elucidar se a promoção do crescimento desses órgãos ocorre devido ao aumento do diâmetro de raízes laterais, ou devido ao aumento do número dessas, ou a ambos os fatores.

Embora os brassinosteróides sejam apontados como hormônios importantes para a adaptação das plantas a estresses (Anuradha e Rao, 2001; Kagale *et al.*, 2007; Shahbaz *et al.*, 2008), alguns dos efeitos observados em parâmetros do crescimento em plantas de *C. cajan* submetidas à salinidade, após aplicação de 24-epibrassinolídeo, também ocorreram na ausência de estresse salino. Os aumentos em massa fresca e seca das raízes e nódulos, no teor de umidade do caule e o aumento na área foliar foram também verificados na ausência de estresse salino, após a aplicação do brassinosteróide. Apesar dos aumentos nesses parâmetros não terem ocorrido exclusivamente sob salinidade, eles se tornam particularmente importantes sob situação de estresse, visto que nessa condição houve redução de diversos padrões avaliados neste trabalho e a aplicação do hormônio atenuou esse efeito.

No presente trabalho o teor de proteínas não foi afetado pela salinidade. Estabilidade na concentração de proteínas sob estresse salino também foi

verificada em plantas de *C. cajan* (Ashraf, 1994), feijão-de-corda (Costa *et al.*, 2003) e em plantas de soja (Queiroz, 2007). Embora possa haver estímulo à proteólise sob situações de estresse (Silveira *et al.*, 2003), é possível que tenha ocorrido síntese de proteínas específicas de estresse (Bouché *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2006; Younis *et al.*, 2009), que compensaram a degradação de proteínas não específicas. Análises mais detalhadas precisariam ser feitas para confirmar se nessas condições está havendo alteração do perfil protéico.

Quanto ao aumento na concentração de aminoácidos livres nas plantas sob estresse salino, resultados semelhantes foram encontrados em plantas de pinhão manso (Silva *et al.*, 2009) e feijão de corda (Aragão *et al.*, 2011), sob salinidade. É possível que parte desse aumento possa ser explicada pela síntese de aminoácidos com função osmorreguladora (Tester e Davenport, 2003). De fato, Dalio *et al* (2011) observaram aumento de prolina em plantas de *C. cajan* tratadas com 400 mM de NaCl. Contudo, é possível também que o estresse salino tenha aumentado a proteólise de proteínas não específicas de estresse.

Embora a aplicação de brassinosteróide não tenha alterado o teor de aminoácidos, em relação às plantas tratadas apenas com NaCl, Dalio (comunicação pessoal) obteve aumento da concentração de aminoácidos totais após aplicação do hormônio em plantas cultivadas sob estresse salino mais severo (400 mM). Portanto, a ausência de efeitos do hormônio observada no presente trabalho deveu-se às concentrações de NaCl usadas. A opção pelo uso de concentrações menores do NaCl, no presente trabalho, deveu-se à necessidade do cultivo das plantas por um período mais longo, a fim de que houvesse folhas senescentes para o cálculo da proficiência de reaproveitamento

de nitrogênio. Sob a concentração de 400 mM de NaCl isso não seria possível, já que o estresse severo abrevia a vida da planta, conforme verificado por Dalio *et al.* (2011).

O excesso de sais no solo pode reduzir o teor de pigmentos fotossintéticos foliares (Sultana *et al.*, 1990) e, conseqüentemente, a taxa fotossintética (Souza *et al.*, 2011). No presente estudo a salinidade afetou os teores de clorofila nos tratamentos com 200 mM de NaCl. Resultados semelhantes foram obtidos com essa mesma espécie, quando cultivada sob concentração maior do NaCl (Dalio *et al.*, 2011). A redução na concentração de clorofilas pode ser explicada pela inibição de sua síntese e/ou aumento de sua degradação, verificadas em plantas cultivadas sob estresse salino (Reddy & Vora 1986; Santos, 2004). As concentrações de clorofila em plantas crescidas em 100 mM de NaCl talvez não tenham sido afetadas, devido ao aumento nos teores de carotenóides, observados nessa mesma concentração de NaCl, visto que esses pigmentos protegem as clorofilas, inibindo a ação de enzimas de degradação, como as clorofilases (Lima *et al.*, 2004).

No presente trabalho, o uso de 24-epibrassinolídeo levou a aumentos nos teores de clorofila *a* e esse aumento refletiu-se na concentração de clorofila total, sob 200 mM de NaCl, em relação às plantas cultivadas na mesma concentração do NaCl e sem aplicação do hormônio. Esse resultado assemelha-se ao encontrado por Anuradha (2003) em plantas de arroz, nas quais o brassinosteróide reduziu os efeitos inibitórios do NaCl nos teores de pigmentos fotossintéticos, resultando na estimulação do crescimento das plantas sob salinidade. No presente trabalho, os aumentos nos teores de clorofila e as

menores reduções nas áreas foliares observados após aplicação do 24-epibrassinolídeo, em plantas cultivadas sob estresse salino, podem ter contribuído para uma maior taxa de fotossíntese, que se refletiu no aumento das massas secas das raízes e dos nódulos. O efeito promotor desse hormônio na fotossíntese foi constatado em plantas não noduladas de *C. cajan* submetidas a estresse salino mais severo (Dalio *et al.*, 2011).

Segundo Behamnia *et al.* (2009), os teores de carotenóides aumentaram em plantas de tomate tratadas com brassinosteróides sob salinidade, o que não aconteceu no presente trabalho. Contudo, sob concentração maior de NaCl, Dalio *et al.* (2011) verificaram que a aplicação de 24-epibrassinolídeo em plantas de *C. cajan* levou a aumento na concentração de carotenóides em relação às plantas cultivadas apenas com NaCl. Segundo Sultana *et al.* (1990) o efeito do estresse salino é agravado pela concentração e pela duração de exposição das plantas ao NaCl. Como no presente trabalho o tempo de exposição ao NaCl foi maior do que no trabalho de Dalio *et al.* (2011), a falta de efeito do 24-epibrassinolídeo sobre o teor de carotenóides, pode ser explicada pelas concentrações menores de NaCl, quando comparadas aos 400 mM aplicados por aqueles autores.

O teor de MDA reflete a peroxidação de lipídios das membranas celulares (Smirnoff, 1993; Rai *et al.*, 2004). Sob salinidade, a concentração de MDA em folhas de *C. cajan* aumentou apenas em plantas que receberam 200 mM de NaCl. Como no tratamento com 100 mM de NaCl não houve aumento desse produto, talvez essa espécie apresente um sistema antioxidante eficiente no controle de radicais livres produzidos pelo estresse oxidativo, sob baixas concentrações de NaCl. O aumento na concentração de MDA, observado em *C. cajan* está de

acordo com os resultados de trabalhos, com espécies diversas, que indicam aumento da peroxidação lipídica sob diferentes tipos de estresse (Zenoff *et al.*, 1994; Queiroz, 1998; Queiroz *et al.*, 2002; Viana, 2002; Verma *et al.*, 2003; Behnamnia *et al.*, 2009).

Neste trabalho, os níveis de MDA não foram alterados pelo uso de brassinosteróide. Esse resultado difere do encontrado por outros autores que sugerem que o uso de brassinosteróides inibe a degradação oxidativa, diminuindo os níveis de MDA, agindo assim como um protetor de membrana (Ershova e Khripach 1996; Wang *et al.*, 2010). Dessa forma, o efeito do 24-epibrassinolídeo na adaptação de plantas de *C. cajan* ao estresse salino aparentemente não ocorre devido à menor degradação de lipídios da membrana.

Na presença de NaCl houve diminuição na atividade da nitrogenase, resultado que está de acordo com observação de Bouhmouch (2005), que afirma que o NaCl leva à redução na fixação de N₂ por bactérias.

A menor atividade da nitrogenase sob salinidade refletiu-se na menor concentração do N total nas folhas verde-maduras e isso refletiu-se na maior eficiência de utilização (massa seca foliar / N foliar) desse mineral. Por outro lado, a salinidade aumentou a concentração de N total em folhas senescentes, diminuindo assim a proficiência de seu reaproveitamento.

Possivelmente a redução do potencial hídrico, decorrente do estresse salino, tenha acelerado a abscisão das folhas. Essa observação está de acordo com os resultados de longevidade foliar apresentados na tabela 2, que indicam que o estresse salino reduziu a longevidade foliar. Dessa forma, é provável que

não tenha havido tempo suficiente para que a retirada de compostos nitrogenados das folhas senescentes se completasse.

Quando se comparam plantas com e sem aplicação do brassinosteróide, na mesma concentração de NaCl, verifica-se que o hormônio influenciou o aumento na massa seca, na massa fresca, no número de nódulos, e na atividade da nitrogenase. Esses aumentos nos diversos parâmetros de fixação de N₂ refletiram-se na maior concentração de N total em folhas verde-maduras. Embora fosse esperado que sob maior disponibilidade de N, devido à maior fixação, houvesse redução da proficiência de reaproveitamento desse mineral, já que sob maior oferta de um mineral a planta tende a investir menos em mecanismos de conservação do mesmo (Killingbeck 1996; Lima *et al.*, 2006a), houve aumento na proficiência de reaproveitamento em plantas de *C. cajan* com aplicação do hormônio. Isso implica numa maior economia do mineral para as plantas que receberam aplicação do hormônio, o que é importante, tendo em vista que a salinidade afeta a disponibilidade desse elemento (Zahran, 1999; Aragão *et al.*, 2011).

O aumento na concentração de compostos nitrogenados em folhas verde-maduras e a redução da concentração desses em folhas abscidadas, após a aplicação do brassinosteróide, indicam que o hormônio estimulou a retirada de compostos nitrogenados das folhas, pelo floema, antes da abscisão foliar.

Quanto ao efeito do 24-epibrassinolídeo na eficiência de utilização do nitrogênio, a maior concentração de compostos nitrogenados nas folhas verde-maduras, decorrente da maior fixação de N₂, foi o fator responsável pela redução nesse parâmetro, já que a produção de massa dessas folhas não foi afetada pela

aplicação do hormônio. Não há trabalhos descritos na literatura enfocando o papel de brassinosteróides na eficiência de utilização de minerais para compararmos aos nossos dados.

7. CONCLUSÃO

A aplicação de brassinosteróide amenizou o efeito do NaCl nas reduções da área foliar e nos teores de clorofila *a* e total. Também atenuou o efeito do estresse salino na atividade da nitrogenase. Esse efeito positivo do hormônio sobre a atividade da enzima refletiu-se no aumento da concentração de compostos nitrogenados nas folhas verde-maduras e reduziu, ainda, a perda de N nas folhas senescentes. Por outro lado, a maior concentração de N total nas folhas verde-maduras de plantas tratadas com o 24-epibrassinolídeo levou à redução da eficiência de utilização desse elemento.

8. REFERÊNCIAS

- Adam, G.; Marquardt, V. 1986.** Brassinosteroids. *Phytochem.* 25:1787-1799.
- Ae, N.; Arihara k; Okada, K.; Yosihara. T.; Johasen, C. 1990.** Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of Indian subcontinent. *Science* 248:477-480.
- Aerts, R.; Verhoeven, J.T.A.; Whigham, D.F. 1999.** Plant-mediated controls on nutrient cycling in temperate fens and bogs. *Ecol.* 80:2170-2181.
- Akintayo, E.T.; Oshodi, A.A.; Esuoso, K.O. 1999.** Effects of NaCl, ionic- strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chem.* 66:51-56.
- Alcântara, F.A.; Furtine, A.E.; Bueno de Paula, N.; Mesquita, H.A.; Muniz, J. 2000.** Adubação verde na recuperação da fertilidade de um latossolo vermelho-escuro degradado. *Pesq. Agrop. Bras.* 35:277-288.
- Alves, S.J.; Medeiros, G.B. 1997.** Leguminosas em renovação de pastagens. In: Simpósio sobre ecossistemas de pastagens. Anais do Simpósio sobre ecossistemas de Pastagens. FAPES/UNES. Jaboticabal. 251-273.
- Amzallag, G.N.; Goloubinoff, P. 2003.** An Hsp90 inhibitor, geldanamycin as a brassinosteroid antagonist: evidence from salt-exposed roots of *Vigna radiata*. *Plant Biol.* 5: 143-150.
- Andrade, S.A.L.; Gratão, P.L.; Schiavinato, M.A.; Silveira, A.P.D.; Azevedo, R.A.; Mazzafera, P. 2009.** Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. *Chemosphere* 75: 1363-1370.

- Anuradha, S.; Rao, S.S.R. 2001.** Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Growth Regul. 33: 151-153.
- Anuradha, S.; Rao, S.S.R. 2003.** Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. Plant Growth Regul. 40:29-32.
- Aragão, R.M.; Silveira, J.A.G.; Silva, E.N.; Lobos, A. K. M.; Dutras, T. B. 2010.** Absorção, fluxo no xilema e assimilação do nitrato em feijão-caupi submetido à salinidade. Rev Ciênc Agron. 41:100-106.
- Aragão, R.M.; Silva, J.S.; Lima, C.S.; Silveira, J.A.G. 2011.** Salinidade modula negativamente a absorção e assimilação de NO₃ em plantas de feijão de corda. Rev Ciênc Agron. 42: 382-389.
- Arnon, D.J. 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1-5.
- Asami, T.; Min, Y.K.; Nagata, N.; Yamagishi, K.; Takatsuto, S.; Fujioka, S. 2000.** Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. Plant Physiol. 123:93-100.
- Ashraf, M. 1994.** Salt tolerance of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) at three growth stages. Ann. Appl. Biol. 124:153-164.
- Ashraf, M.; Ali, Q. 2008.** Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). Environ. Exp. Bot. 63: 266-273.

- Azevedo Neto, A.D.; Prisco, J.D.; Enéas-Filho, J.; Lacerda, C.F.; Silva, J.V.; Costa, P.H.A.; Gomes-Filho, E. 2004.** Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Braz. J. Plant Physiol.* 16:31-38.
- Bajguaz, A.; Tretyn, A. 2003.** The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62:1027–1046.
- Bajguaz, A. 2009.** Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae). *J. Plant Physiol.* 166:1946-1949.
- Batista, M.J. 1991.** Água: Manual de irrigação, guia rural. São Paulo: Abril, 170p.
- Behnamnia, M.; Kalantari, Kh.M.; Rezanejad, F. 2009.** Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum* L. *Gen. Appl. Plant. Physiol.* 35: 22-34.
- Borochoy-Neori, H.; Borochoy, A. 1991.** Response of melon plants to salt: 1. Growth, morphology and root membrane properties. *J. Plant Physiol.* 139:100-105.
- Bouché, N.; Yellin, A.; Snedden, W.A.; Fromm, H. 2005.** Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:435-466.
- Bouhmouch, I.; Souad-Mouhsine, B.; Brhada, F.; Aurag, J. 2005.** Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *J. Plant Physiol.* 162:1103-1113.

- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Carillo, P.; Mastrolonardo, G.; Nacca, F.; Fuggi, A. 2005.** Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity. Funct. Plant Biol. 32:209-219.
- Chabot, B.F.; Hicks, D.J. 1982.** The ecology of leaf life spans. Ann. Rev. Ecol. Syst. 13:229-259.
- Costa, P.H.A.; Silva, J.V.; Bezerra, M.A.; Enéas Filho, J.; Prisco, J.T.; Gomes Filho, E. 2003** Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. Rev. Bras. Bot. 26:289-297.
- Cocking, E.C.; Yemm, E.W. 1955.** Estimation of amino acids by ninhidrin. Biochem. J. 58:12-13.
- Covelo, F.; Gallardo, A. 2002.** Effect of pine harvesting on leaf nutrient dynamics young oak trees at NW Spain. For. Ecol. Manage. 167:161-172.
- Creelman, R.A.; Mason, H.S.; Bensen, R.J.; Boyer, J.S.; Mullet, J.E. 1990.** Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. Plant Physiol. 92:205-214.
- Dalio, R.J.D. 2007.** Efeito do brassinosteróide no crescimento, parâmetros bioquímicos e transporte de aminoácidos em plantas de *Cajanus cajan* (L.) Mill sp, submetida a estresse salino. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biologia Vegetal – Universidade de Campinas) 65p.

- Dalio, R.J.D.; Prisco, H.P.; Sodek, L.; Haddad, C.R.B. 2011.** The effect of 24-epibrassinolide and clotrimazole on the adaptation of *Cajanus cajan* (L.) Mill sp to salinity. *Acta Physiol. Plant.* 33:1887-1896.
- Debez, A.; Saadaoui, D.; Ramani, B.; Ouerghi, Z.; Koyro, H.W.; Huchzermeyer, B.; Abdelly, C. 2006.** Leaf H⁺-ATPase activity and photosynthetic capacity of *Cakile maritima* under increasing salinity. *Environ. Exp. Bot.* 57: 285-295
- Debez, A.; Koyro, H.W.; Grignon, C.; Abdelly, C.; Huchzermeyer, B. 2008.** Relationship between the photosynthetic activity and the performance of *Cakile maritima* after long-term salt treatment. *Physiol. Plant.* 133: 373-385
- Distel, R.A.; Moretto, A.S.; Didoné, N.G. 2003.** Nutrient resorption from senescing leaves in two *Stipa* species native to central Argentina. *Aust. Ecol.* 28:210-215.
- Dutilleul, C.; Garmier, M.; Noctor, G.; Mathieu, C.; Chétrit, P.; Foyer, C.H.; Paepe, R. 2003.** Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell.* 15:1212-1226.
- Ershova, A.; Khripach, V. 1996.** Effect of epibrassinolide on lipid peroxidation in *Pisum sativum* at normal aeration and under oxygen deficiency. *Russ. J. Plant Physiol.* 43:750–52
- Fariduddin, Q.; Ahmad, A.; Hayat, S. 2004.** Responses of *Vigna radiata* to foliar application of 28-homobrassinolide and Kinetin. *Biol. Plant.* 48:465-468.

- Ferguson, B.J.; Ross, J.J.; Reid, J.B. 2005.** Nodulation phenotypes of gibberellins and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiol.* 138:2396-2405.
- Ferri, A.; Lluch, C.; Ocaña, A. 2000.** Effect of salt on carbon metabolism and bacteroid respiration in root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant. Biol.* 2:396-402.
- Foyer, C.H. e Noctor, G. (2005a),** Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28:1056-1071.
- Foyer, C.H. e Noctor, G. (2005b),** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* 17:1866-1875.
- Föhse, D.N.; Claassen, N.; Jungk, A. 1988.** Phosphorus efficiency of plants. I. External and internal P requirement and P uptake efficiency of different plant species. *Plant Soil* 110:101-109.
- Flowers, T.J.; Yeo, A.R. 1995.** Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust. J. Plant Physiol.* 28:89-121.
- Frechill, S.; Lasa, B.; Ibarretxe, L.; Lamsfus, C.; Aparicio Trejo, P. 2001.** Pea responses to saline estress is affected by the source of nitrogen nutrition (ammonium or nitrate). *Plant Growth Regul.* 35:171-179.
- Freire, A.L.O.; Rodrigues, T.J.D. 2009.** A salinidade do solo e seus reflexos no crescimento, nodulação e teores de N, K e Na. *Eng. Amb.* 6:163-173.

- Fujioka, S.; Choi, Y.H.; Takatsuto, S.; Yokota, T.; Chory, J.; Sakurai, A. 1996.** Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, typhasterol and 6-deoxytyphasterol from the shoots of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 37:1201-1203.
- Fujioka, S.; Yokota, T. 2003.** Biosynthesis and metabolism of brassinosteroid. Annu. Rev. Plant Biol. 54:137-164.
- Garcia-Valenzuela, X.; Gargia-Moyab, E.; Cruz, Q.R.; Herrera-Estrella, L.; Aguado-Santacruz, G. A. 2005.** Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyllic cells. J. Plant Physiol. 162: 650-656.
- Garg, N.; Chandel, S. 2011.** The effects of salinity on nitrogen fixation and trehalose metabolism in micorrhizal *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. Plants. J Plant Growth Regul. 30:490-503.
- Giomo, G.S.; Razera, L.F.; Nakagawa, J. 2001.** Espaçamentos para produção de sementes de guandu em semeadura tardia. Bragantia 60:121-126.
- Ghoulam, C.; Foursy, A.; Fares, K. 2002.** Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. Env. Exp. Bot. 47: 39-50.
- Gondim, T.M.S.; Cavalcante, L.F.; Beltrão, N.E.M. 2010.** Aquecimento global: salinidade e consequências no comportamento vegetal. Revista Brasileira de oleoginosas e fibrosas. 14: 37-54.
- Gratão, P.L.; Polle, A.; Lea P.J.; Azevedo, R.A. 2005.** Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Fun. Plant Biol. 32:481-494.

- Grove, M.D.; Spencer, G.F.; Rohwedder, W.K.; Mandava, N.; Worley, J.F.; Jr, J.D.W.; Steffens, G.L.; Flippen-Anderson, J.L.; Carter Cook, J. 1979.** Brassinolide, a plant growth-promoting esteroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*. 281: 216-217.
- Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D.; Jackson, E.K.; Burns, R.C. 1968.** The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185-1207.
- Heath, R.L.; Packer, L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:189-198.
- Hiscox, J. D.; Israelstam, G. F. 1979.** A method for the extration of chorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57:1332-1334.
- Hoagland, D.R. e Arnon, D.I. 1939.** The water culture method of growing plants without soil. Berkley, University of California-Agricultural Experiment Station, 39p (Circular 347).
- Houaiss, A.; Villar, M.S. 2004.** Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. Objetiva, Rio de Janeiro, 2922 p.
- Hungria, M.; Araújo, R.S. 1994.** Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. EMBRAPA. Serviço de Produção de informação, Brasília, DF, 542 p.
- Kagale, S.; Divi, U.K.; Krochko, J.E.; Keller, W.A.; Krishna, P. 2007.** Brassinosteroids confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225:353-364.

- Keating, B.A.; Fisher, J.M. 1985.** Comparative tolerance of tropical grain legumes to salinity. Aust. J. Agric. 36: 373-383.
- Khadri, M.; Pliego, L.; Soussi, M.; Lluch, C.; Ocaña, A. 2001.** Ammonium assimilation and ureide metabolism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. Agro. 21:635-643.
- Kennedy, I.R.; Rigoud, J.; Trinchant, J.C. 1975.** Nitrate reductase from bacterioids of *Rhizobium japonicum*: enzyme characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. Biochim. Biophys. Acta. 397:24-35.
- Khripach, V.A.; Zhabinskii, V.N.; Groot, A.E. 1999.** Brassinosteroids. A new class of plant hormones. Academic Press, San Diego, 455 p.
- Killingbeck, K.T. 1996.** Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. Ecol. 77:1716-1727.
- Lacerda, C.F.; Assis, O.J.J.; Lemos, L.C.^a; Oliveira, T.S.; Guimarães, F.V.A.; Gomes, E.; Prisco, J.T.; Bezerra, M.A. 2007.** Morpho-physiological responses of Cowpea leaves to salt stress. Braz. J. Plant Physiol. 18:455-465.
- Larcher, W. 2000.** Ecofisiologia Vegetal. Rima, São Carlos, 531p.
- Lichtenthaler, H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Methods in Enzymology (Colowick, S. P; Kaplan, N.O; eds.) Vol. 148, Academic Press. Inc. New York. 350-382.
- Lima, M.G.S.; Lopes, N.F.; Bacarin, M.A.; Mendes, C.R. 2004.** Effect of salt stress on pigments and proline concentrations in leaves of rice. Bragantia. 63:335-340.

- Lima, A L.S.; Zanella, F.; Schiavinaxto, M.A.; Haddad, C. R. 2006a.** N availability and mechanisms of N conservation in deciduous and semideciduous tropical forest legumes trees. *Acta Bot. Bras.* 20:625-632.
- Lima, A.L.S.; Zanella, F.; Schiavinato, M.A.; Haddad, C.R.B. 2006b.** Nitrogenous compounds, phenolic compounds and morphological aspects of leaves: comparison of deciduous and semideciduous arboreal legumes. *Sci. Agric.* 63:40-45.
- Lohauss, G.; Hussmann, M.; Pennewiss, K.; Scheneider, H.; Zhu, J.; Sattelmacher, B. 2000.** Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J. Exp. Bot.* 51:1721-1732.
- Maesen, L.J.G. 1980.** van der. Taxonomy of Cajanus. In: International Workshop on pigeonpeas. India Proceedings. 2:9-13.
- Mandava, N.B. 1988.** Plant growth-promoting brassinosteroid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 39:23-52.
- Mansour, M.M.F.; Lee-Staldermann, O.Y.; Stadelmann, E.J. 1993.** Salinity stress and cytoplasmatic factors. A comparison of cell permability and lipid partiality in salt sensitive and salt resistant cultivars and lines of (*Triticum aestivum*) and (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.* 88:141-148.
- Mansour, M.M.F. 1995.** NaCl alteration of plasma membrane of (*Allium cepa*) epidermal cells, Alleviation by calcium. *J. Plant. Physiol.* 145:726-730.
- Marcellis, L.F.M.; Hooidjdonk, J. V. 1999.** Effect of salinity on growth, water use and nutrient use in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil.* 215:57-64.

- Martins, S.S.; Pereira, M.C.; Lima, M.A.G.; Queiroz, A. A.; Silva, S.A.B.; Mistura, C.; Rodrigues, J.D.; Orika Ono, E. 2012.** Morfofisiologia da cunhã cultivada sob estresse salino. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim. 13: 13-24.
- May, J.D.; Killingbeck, K. T. 1992.** Effects of preventing nutrient resorption on plant fitness and foliar nutrient dynamics. Ecol. 73:1868-1878.
- Meloni, D.A.; Gulotta, M.R.; Martinez, C.A.; Oliva, M.A. 2004.** The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Proposis alba*. Braz. J. Plant Physiol. 16:39-46.
- Mendes, B. S. S.; Willadino, L.; Cunha, P. C.; Oliveira filho, R. A.; Camara, T. R. 2011.** Mecanismos fisiológicos e bioquímicos do abacaxi ornamental sob estresse salino. Revista Caatinga 24: 71-77.
- McCree, J.K. 1986.** Whole-plant carbon balance during osmotic adjustment to drowght and salinity stress. Aust. J. Plant Physiol. 13:33-43.
- Mhamdi, A.; Hager, J.; Chaouch, S.; Queval, G.; Han, Y.; Taconnat, L.; Saindrenan, P.; Gouia, G.; Issakidis-Bourguet, E.; Renou, J.P.; Noctor, G. 2010.** Arabidopsis glutathione reductase₁ plays a crucial role in leaf responses to intracellular hidrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. Plant Physiol. 153: 1144-1160.
- Morillon, R.; Catterou, M.; Sangwan, R.S.; Sangwan, B.S.; Lassalles, J.P. 2001.** Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabdopsis thaliana*. Planta. 212: 199-204.
- Munns, R.; Termaat, A. 1986.** Whole-plant responses to salinity. Aust. J. Plant Physiol. 13: 143-160.

- Munns, R.; James, R.A.; Lauchli, A. 2006.** Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57:1025-1043.
- Munns, R.; Tester, M. 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. of Plant Biol.* 59: 651-681.
- Nandwal, A.S.; Godara, M.; Kamboj, D.V.; Kundu, B.S.; Mann, A.; Kumar, B.; Sharma, S.K. 2000.** Nodule functioning in trifoliate and pentafoliate mungbean genotypes as influenced by salinity. *Biol. Plant.* 43:459-462.
- Nelson, D.W.; Sommers, L.E. 1973.** Determination of total nitrogen in plant material. *Agron. J.* 65:109-112.
- Nene, Y.L.; Sheila, V.K. 1990.** Pigeonpea: geography and importance. In: NENE Y.L; HALL S.D; SHEILA V.K. (Eds). *The Pigeonpea*. Cambridge: CAB International/ ICRISAT. p.1-14.
- Netondo, G.W.; Onyango, J.C.; Beck, E. 2004.** Sorghum and salinity: II. Gas Exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci.* 44:806-811.
- Nemhauser, J.L.; Mockler, T.C.; Choe, J. 2004.** Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 2: 258-268.
- Núñez, M.; Mazzafera, P.; Mazzora, L.M.; Siqueira, W.J.; Zullo, M.A.T. 2003.** Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidation enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. *Biol. Plant.* 47:67-70.
- Okuzanya, O.T. 1977.** Effect of sea water and temperature on germination behaviour of *Crithmum maritimum*. *Physiol. Plant.* 41:265-267.

- Ozdemir, F.; Bor, M.; Demiral, T.; Turkan, I. 2004.** Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oriza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regul.* 42:203-211.
- Parker, R.; Flowers, T.J.; Moore, A.L.; Harpham, N.V.J. 2006.** An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *J. Exp. Bot.* 57: 1109-1118.
- Pugnaire, F.I.; Chapin, F.S. 1993.** Controls over nutrients resorption from leaves of evergreen mediterranean species. *Ecol.* 74:124-129.
- Queiroz, C.G.S.; Alonso, A.; Mresguia, M.; Magalhães, A.C. 1998.** Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffe arabica* L. roots. *Biol. Plant.* 41: 403-413.
- Queiroz, C.G.S.; Garcia, Q.S.; Filho, J.P.L. 2002.** Atividade fotossintética de lipídeos de membrana em plantas de aroeira do sertão sob estresse hídrico e após re-hidratação. *Braz. J. Plant Phisiol.* 14:59-63.
- Queiroz, M.H. 2007.** Efeito do sal no crescimento e metabolismo de plantas de *Glycine Max* L., cv. IAC 17. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biologia Vegetal - Universidade de Campinas) 45 p.
- Queval, G.; Jaillard, D.; Zechmann, B.; Noctor, G. 2011.** Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Env.* 34:21-32.

- Racagni, G.; Pwedranzani, H.; Alemanno, S.; Taleisni, E.; Abdala, G.; Machado-Domenech, E. 2003/4.** Effect of short-term salinity on lipid metabolism and ion accumulation in tomato roots. *Biol. Plant.* 47:373-377.
- Rai, V.; Vajpayee, P.; Singh, S.N.; Mehrotra, S. 2004.** Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Sci.* 167:1159-1169.
- Reddy, M.P.; Vora, A.B. 1986.** Changes in pigment composition, Hill reaction activity and saccharides metabolism in Bajra leaves under NaCl salinity. *Photosynt.* 20:50-55.
- Saab, I.N.; Sharp, R.E.; Pritchard, J.; Voetherg, G.S. 1990.** Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol.* 93:1329-1336.
- Saíram, R. K. 1994.** Effects of homobrassinolide application on metabolic-activity and grain yield of two wheat under normal and water stress condition. *J. Agron. Sci.* 173:11-16.
- Santos, C.A.F.; Menezes, E.A.; Araújo, F.P. 1996.** Introdução, coleta e caracterização de recursos genéticos de guandu para produção de grãos e forragem. Recursos Genéticos e Melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro. Petrolina. EMBRAPA Semi-árido/CPATSA.
- Santos, C.V. 2004.** Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Sci Hort.* 103: 93-99.

- Sasse, J.M. 1997.** Recente progress in brassinosteroid research. *Physiol. Plant.* 100: 93-99.
- Shahbaz, M.; Ashraf, M.; Athar, H.R. 2008.** Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induce growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Growth Regul.* 1:51-64.
- Sharma, P.K.; Hall, D.O. 1991.** Interaction of salt estress and photoinhibition ond photosynthesis in balrley and sorghun. *J. Plant Physiol.* 138:614-619.
- Sharma, P. K. 1996.** Soil salinity effects on transpiration an net photosynthetic rates, stomatal conductance and Na⁺ and Cl⁻ contents in durum wheat. *Biol. Plant.* 38:519-523.
- Sheldrake, A. R.; Narayanan, A. 1979.** Growth, development, and nutrient uptake in pigeonnea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *J. Agr. Sci.* 52:513-526.
- Skala, W.D.; Cadisch, G.; Giller, K. 2000.** Interactions between residues of maize and pegeonnea and mineral fertilizers during decomposition and N mineralition. *Soil Biol. Biochem.* 32:679-688.
- Silva, E.C.; Nogueira, R.K.M.C.; Araújo, F.P.; Melo, N.F.; Azevedo, A.D. 2008.** Physiological responses to salt stress in young umbu plants. *Environ. Exp. Bot.* 63:147-157.
- Silva, S.M.S.; Alves, A.N.; Gheyi, H.R.; Beltrão, N.E.M.; Severino, L.S.; Soares, F.A.L. 2008.** Desenvolvimento e produção de duas cultivares de mamoneira sob estresse salino. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental* 12: 335-342.
- Silva, E.N.; Silveira, J.A.G.; Rodrigues, C.R.F.; Lima, C.S.; Viegas, R.A. 2009.** Contribuição de solutos orgânicos e inorgânicos no ajustamento osmótico de pinhão-mansô submetido à salinidade. *Pesq. agropec. bras.* 44:437-445.

- Silveira, J.A.G.; Viegas, R.D.; da Rocha, I.M.A.; Moreira, A.C.D.M.; Moreira, R.D.; Oliveira, J.T.A. 2003.** Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *J. Plant Physiol.* 160:115-123.
- Smirnoff, N. 1993.** The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125:27-58.
- Souza, R. P.; Machado, E. C.; Silveira, J. A. G.; Ribeiro, R. V. 2011.** Fotossíntese e acúmulo de solutos em feijoeiro caupi submetido à salinidade. *Pesq. agropec. bras.* 46: 586-592.
- Sultana, N.; Ikeda, T.; Itho, R. 1999.** Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environ. Exp. Bot.* 42:11-220
- Szabados, L.; Saviouré, A. 2009.** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15:89-97.
- Szabolcs, I. 1994.** Soils and salinization. *In Handbook of Plant and Crop Stress.* M. Pessarakli (Ed) p. 3–11.
- Terakado, J.; Shinsuke, F.; Shigedo, G.; Kuratani, R.; Suzuki Y.; Yoshida S.; Yoneyama T. 2005.** Systemic effect of a brassinosteroid on root nodule formation in soybean as revealed by application of brassinolide and brassinazole. *Soil Sci. Plant Nutr.* 51:389-395.
- Tester, M.; Davenport, R. 2003.** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503-527.

- Umezawa, T.; Mizuno, K.; Fujimura, T. 2002.** Discrimination of genes expressed in response to the ionic or osmotic effect of salt stress in soybean whit cDNA-AFL. *Plant Cell Env.* 25:1617-1625.
- Upreti, K.K.; Murti, G.S.R. 2004.** Effects of brassinosteroids on growth, nodulation, phytochrome content and nitrogenase activity in French bean under water stress. *Biol Plant.* 48: 407-411.
- Vardhini, B.V.; Rao, S.S.R. 1997.** Effect of brassinosteroids on salinity induced growth inhibition of ground nut seedlings. *Indian J. Plant Physiol.* 2: 156-157.
- Vardhini, B.V.; Anuradha, S.; Rao, S.S.R. 2006.** Brassinosteroids-New class of hormone with potential to improve crop productivity. *Indian J. Plant Physiol.* 11: 1-12.
- Vardhini, B.V.; Sujatha, E.; Rao, S.S.R. 2012.** Influence of brassinosteroid on metabolites of *Raphanus sativus* L. *Journal of Phytology* 4: 45-47.
- Viana, M.C.M. 2002.** Déficit hídrico em genótipos de milho com tolerância diferencial à seca. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 75 f.
- Verma, S.; Dubey, R.S. 2003.** Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.* 164:645-655.
- Vitousek, P.M. 1984.** Litterfall, nutrient cycling and nutrient limitation in tropical forest. *Ecol.* 65:285-298.
- Wang, C.W.; Qu G.Z.; Li, H.Y.; Wu, Y.J.; Wang, C.; Liu, G.F.; Yang, C.P. 2010.** Enhanced salt tolerance expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii*. *Mol.Biol.Rep.* 2:1119-1124.

- Williams, L.E.; Miller, A.J. 2001.** Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 52:659-688.
- Wutke, E.B. 1987.** Características fenológicas e avaliação agronômica de genótipos de guandu (*Cajanus cajan* (L) Mill SP). Dissertação de Mestrado – ESALQ, Piracicaba. 166p.
- Younis, M.E.; Hasaneen, M.N.; Kazamel, A.M.S. 2009.** Plant growth metabolism and adaptation to stress conditions. XXVII. Can ascorbic acid modify the adverse effects of NaCl and manitol on amino acids, nucleic acids and protein patterns in *Vicia faba* seedlings? *Protop.* 235:37-47.
- Zenoff, A.M.; Hilal, M.; Galo, M.; Moreno, H. 1994.** Changes in roots lipid composition and inhibition of the extrusion of protons during salt stress in two genotypes of soybean resistant or susceptible to stress. Varietal differences. *Plant Cell Physiol.* 35:729-735.
- Zahran, H.H. 1999.** *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in a arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 12:968-989.
- Zhu, J. K. 2001.** Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:66–71.
- Zullo A. T; Adam G. 2002.** Brassinosteroid phytohormones - structure, bioactivity and applications. *Braz. J. Plant Physiol.*, 14(3):143-181, 200