

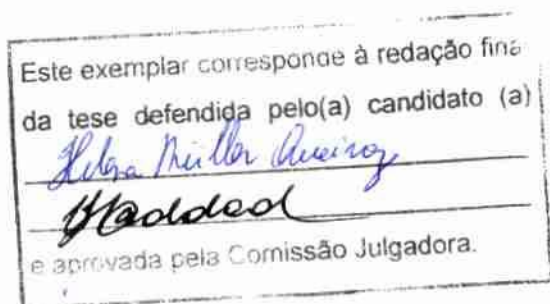
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

HELENA MÜLLER QUEIROZ



EFEITO DO SAL NO CRESCIMENTO E METABOLISMO DE PLANTAS DE *Glycine max* L., cv.

IAC 17



**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do Título
de Mestre em Biologia Vegetal.**

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Q32e	Queiroz, Helena Müller Efeito do sal no crescimento e metabolismo de plantas de <i>Glycine max</i> L., cv. IAC 17 / Helena Müller Queiroz . – Campinas, SP: [s.n.], 2007. Orientadora: Cláudia Regina Baptista Haddad. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Soja. 2. Estresse salino. 3. Amino ácidos. 4. Crescimento. I. Haddad, Cláudia Regina Baptista. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (scs/ib)
-------------	---

Título em inglês: Effect on salt in the growth and metabolism of *Glycine max* L. cv. IAC 17.

Palavras-chave em inglês: Soybean; Salt stress; Amino acids; Plant growth.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Cláudia Regina Baptista Haddad, Eduardo Caruso Machado, Gláucia Moraes Dias Tagliacozzo.

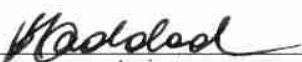
Data da defesa: 21/03/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 21 de março de 2007

BANCA EXAMINADORA

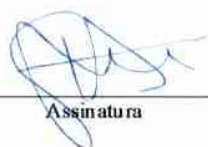
Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad
(Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado


Assinatura

Profa. Dra. Glaucia Moraes Dias Tagliacozzo


Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Assinatura

Dr. Milton Massao Shimizu

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir a realização desta tese.

Aos meus pais, Ana e Marivaldo, e aos meus irmãos, Elisa e Oscar, pelo estímulo.

Ao meu marido, Chris, pelo carinho e apoio.

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de realização do curso.

À Profa. Dra. Cláudia R. B. Haddad pela orientação, compreensão e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek pelo auxílio no estudo do transporte de aminoácidos.

Aos Professores Jorge Vega e Marlene Schiavinato pelas críticas e sugestões à tese.

À Dulcinéia e ao Paiola e aos demais funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal por serem imprescindíveis na execução do meu projeto.

À Maria Cristina, ao Milton e aos demais colegas de curso pela amizade.

Ao Prof. Marco A. T. Zullo e à Profa. Dra. Mariangela B. A. M. pelo incentivo.

E à minha avó, Helena Müller, a quem dedico esta tese.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	vii
Resumo.....	viii
Summary.....	x
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	8
3. Material e Métodos.....	9
3.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	9
3.1.1. Exposição das plantas de soja ao estresse salino.....	9
3.2. Medida dos parâmetros de crescimento.....	10
3.2.1. Altura da parte aérea e comprimento das raízes.....	10
3.2.2. Área foliar.....	10
3.2.3. Massa fresca.....	10
3.2.4. Massa seca.....	10
3.2.5. Massa seca livre de cinzas.....	11
3.2.6. Conteúdo de água.....	11
3.3. Medida dos parâmetros bioquímicos.....	11
3.3.1. Dosagem de proteínas nas folhas.....	11
3.3.2. Extração de metabólitos das raízes.....	12
3.3.3. Dosagem de nitrato (NO_3^-) nas raízes.....	12
3.3.4. Dosagem de açúcares solúveis totais nas raízes.....	12
3.3.5. Dosagem de aminoácidos solúveis totais nas raízes.....	13
3.3.6. Coleta da seiva do xilema.....	13
3.3.7. Separação e análise da composição de aminoácidos livres na seiva	

do xilema por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	14
3.3.8. Quantificação dos aminoácidos livres totais (ALT) na seiva do xilema..	17
3.4. Delineamento experimental e análise estatística.....	17
4. Resultados.....	18
4.1. Efeito da salinidade no crescimento.....	18
4.2. Efeito da salinidade em parâmetros bioquímicos.....	25
5. Discussão.....	30
6. Conclusões.....	36
7. Literatura Citada.....	37

ABREVIATURAS

alanina	ALA
arginina	ARG
asparagina	ASN
ácido aspártico	ASP
glutamina	GLN
ácido glutâmico	GLU
fenilalanina	PHE
glicina	GLY
histidina	HIS
isoleucina	ILE
leucina	LEU
lisina	LYS
prolina	PRO
serina	SER
tirosina	TYR
valina	VAL
ácido gama-aminobutírico	GABA
α – cetoglutarato	α KG
piruvato	PYR
oxaloacetato	OAA

RESUMO

A salinidade inibe o crescimento das plantas e interfere na produtividade de espécies cultivadas.

Com o objetivo de verificar alterações no crescimento e metabolismo, plantas de soja, *Glycine max* (L.) Merr., cv. IAC 17, foram cultivadas na presença de NaCl, nas concentrações de 50 mM, 100 mM e 200 mM.

A análise dos parâmetros de crescimento revelou que as raízes de plantas de soja são menos afetadas pelo sal do que a parte aérea. O comprimento e a massa fresca das raízes não foram afetados em concentrações elevadas de sal. Dados na literatura relatam que a manutenção do crescimento normal das raízes sob condições adversas de cultivo demonstra que a planta pode apresentar tolerância ao sal. Sob salinidade houve aumento do conteúdo de água das raízes, o que pode estar relacionado com a maior tolerância ao estresse salino, pois, desta forma, a planta conseguiria diminuir a concentração de sais no citoplasma.

Observou-se um decréscimo gradativo na área foliar, massas secas e secas livres de cinzas de folhas, caules e raízes com o aumento da salinidade.

O teor de proteínas em folhas de plantas de soja não foi alterado significativamente pela salinidade, em relação ao controle, uma explicação para o fato é a possibilidade de ter havido aumento na síntese de proteínas específicas de estresse. Outra possibilidade é que a duração do experimento não tenha sido suficiente para que fossem observadas alterações na concentração de proteínas.

Não houve uma relação clara entre a concentração de açúcares solúveis totais nas raízes e a concentração de NaCl no meio de cultivo, indicando que os açúcares solúveis não devem estar envolvidos no ajustamento osmótico em plantas de soja.

Houve redução nas concentrações de nitrato e aminoácidos solúveis totais nas raízes, quando as plantas foram submetidas à salinidade. A redução na concentração de aminoácidos livres totais pode estar ligada à diminuição da absorção de nitrato pelas raízes, devido a uma possível interferência exercida pelo Cl^- sobre transportadores de membrana, que limitaria a entrada do nitrato nas raízes. Diante de uma menor absorção de nitrato, haveria limitação na assimilação do nitrogênio necessário para a síntese de aminoácidos.

A salinidade provocou alterações no perfil de aminoácidos transportados no xilema. Houve um aumento na concentração de SER, ALA, GABA e PRO e redução de ASN no exsudato do xilema de plantas submetidas aos tratamentos com solução salina. A diminuição da concentração de ASN pode ter ocorrido devido à interconversão deste aminoácido em ALA. Nas raízes de plantas controle, os aminoácidos que apresentaram a maior proporção foram ASN, GABA e GLU, respectivamente e, após a adição de sal ao meio, apenas a concentração do aminoácido ASN diminuiu.

A PRO e o GABA têm um possível papel na redução da acidificação do citosol, sob estresse salino. Apesar da elevação observada dos mesmos não foi suficiente para evitar a redução do crescimento sob salinidade, uma vez que houve diminuição da massa seca das plantas de soja.

SUMMARY

Salinity inhibits plant growth and crop production.

With the objective of verifying changes in metabolism and growth, soybean plants (*Glycine max* (L) Merr., cv. IAC 17) were cultivated in the presence of different NaCl concentrations (50 mM, 100 mM and 200 mM).

The analysis of growth parameters showed that the roots of soybean plants are less affected by salt than the shoot. The length and fresh matter of roots were not significantly reduced by the increase in salt concentration. Data from the literature indicate that normal growth of roots under adverse conditions may demonstrate the capacity of plants to tolerate salt stress. The increase of water content in roots of soybean plants cultivated at higher salt concentrations can be related with salt tolerance, since the increase of water reduces salt concentration inside the cytoplasm.

A gradual decrease was observed in leaf area, dry matter and ash-free dry matter of leaves, stem and roots, with the increase of salinity.

The protein concentration of soybean leaves was not significantly changed by the salinity. The explanation for this is probably related to the increase of specific proteins synthesized by the plants under stress conditions. Another possibility is that the experimental period was not enough to allow observations in changes of protein concentrations.

There was no clear relationship between total soluble sugars located in the root system and the NaCl concentration, which may indicate that these were not used by the plant for osmotic adjustment.

A reduction of nitrate and total soluble amino acids was observed in plants affected by salinity. The reduction of free total amino acids may be related to the decrease of nitrate absorption by the roots, possibly resulting from an interference of Cl^- on membrane nitrate transporters.

Salinity changed the amino acid profile transported in the xylem. There was an increase in concentration of SER, ALA, GABA and PRO and reduction of ASN in xylem sap of plants under salt stress. The decrease of ASN can be explained by the interconversion of this into ALA. In the roots of control plants the most abundant amino acids were ASN, GABA and GLU, respectively, and after the addition of salt, only the ASN level was reduced.

Some authors consider that PRO and GABA have a role in the reduction of cytosol acidification under salinity stress. Although an increase in PRO and GABA were observed, it did not avoid the reduction of growth, as shown by the reduction of dry matter in plants under salt stress.

1. INTRODUÇÃO

A salinidade é um dos fatores ambientais que podem interromper o crescimento das plantas e interferir na produtividade de espécies cultivadas, que são predominantemente sensíveis às altas concentrações de sal no solo (Flowers *et al.*, 1977; Ghoulam *et al.*, 2002; Ehsanpour & Fatahian, 2003). A sensibilidade da planta ao sal varia entre as espécies e depende do tipo de sal, do tempo de exposição, do estágio de desenvolvimento da planta, da umidade e da intensidade de luz (Flowers *et al.*, 1977; Costa *et al.*, 2003; Ashraf & Harris, 2004).

Cerca de 10 % da superfície terrestre é constituída por solos afetados pela salinidade (Szabolcs, 1994; Tester & Davenport, 2003). Solos que naturalmente apresentam elevada concentração de sais são encontrados na costa marítima, em estuários e em áreas adjacentes a depósitos geológicos marinhos (Szabolcs, 1994; Haddad & Mazzafera, 1999; Tester & Davenport, 2003). Além disso, há o acúmulo de sais em áreas de cultivo, devido a práticas inadequadas de irrigação, causando problemas na agricultura (Ghoulam *et al.*, 2002; Demiral & Türkan, 2005). A água em regiões semi-áridas e áridas é freqüentemente rica em sais, o que resulta na concentração de sais no solo após a irrigação (Flowers *et al.*, 1977; Subbarao *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2003).

As plantas podem ser divididas em dois grupos de acordo com sua sensibilidade à presença de sal: halófitas e glicófitas. Em geral, enquanto as halófitas podem completar seu ciclo de vida em ambientes salinos, com 0,5% ou mais de sal, (O'Leary & Glenn, 1994; Haddad & Mazzafera, 1999), as glicófitas não o completam nessas condições (Haddad & Mazzafera, 1999). A maioria das plantas cultivadas é sensível ao sal e, portanto, glicófita. Os processos de biossíntese do metabolismo

fundamental, como fotossíntese e respiração, são sensíveis ao sal tanto em halófitas como em glicófitas (Volkmar *et al.*, 1998).

A elevada concentração de NaCl no substrato de cultivo causa uma expressiva redução nos parâmetros de crescimento das plantas (Ghoulam *et al.*, 2002). Geralmente, as massas frescas e secas de plantas crescendo em ambiente salino diminuem, como observado em oliveira (Tabatabaei, 2006), cajueiro (Silveira *et al.*, 2003), plantas de feijão-de-corda (Costa *et al.*, 2003) e de arroz (Misra *et al.*, 1997). Também houve redução da área foliar em oliveira (Tabatabaei, 2006), plantas de feijão-de-corda (Costa *et al.*, 2003), de beterraba (Ghoulam *et al.*, 2002) e de arroz (Misra *et al.*, 1997).

A salinidade tem dois efeitos nas plantas, os efeitos devidos à redução do potencial hídrico do solo, dificultando a entrada de água na planta, e os efeitos tóxicos específicos dos sais (Lewis *et al.*, 1989; Volkmar *et al.*, 1998; Umezawa *et al.*, 2002; Carillo *et al.*, 2005). Com a redução do potencial hídrico do solo as plantas precisam reduzir também o potencial osmótico de suas células para manter o gradiente de água do solo para a planta. Este processo é chamado de “ajustamento osmótico” e ocorre tanto em glicófitas, como em halófitas (Prisco, 1980; Demiral & Türkan, 2005).

Durante o ajustamento osmótico há acúmulo de solutos orgânicos compatíveis (Ghoulam *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003; Kafi *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2003; Ashraf & Harris, 2004; Carillo *et al.*, 2005; Misra & Gupta, 2005; Koyro, 2006). Solutos compatíveis são definidos como compostos orgânicos responsáveis pelo balanço osmótico e que são compatíveis com o metabolismo celular (Yeo, 1998). Uma grande variedade desses solutos apresenta alta solubilidade e higroscopia (Hasegawa & Bressan, 2000). Devido a essas propriedades, esses solutos

contribuem para a manutenção do turgor celular e estabilizam a conformação ativa de enzimas citoplasmáticas, protegendo-as contra a inativação por íons inorgânicos (Volkmar *et al.*, 1998; Carillo *et al.*, 2005). Os solutos compatíveis incluem compostos tais como a PRO, a glicina betaína e outros compostos de amônio quartenário e ainda, pinitol, manitol e sorbitol (Volkmar *et al.*, 1998; Jain *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2003; Ashraf & Harris, 2004). Geralmente as plantas tolerantes têm mais açúcares solúveis que as sensíveis (Ashraf & Harris, 2004). Alguns trabalhos mostram que os açúcares solúveis contribuem com mais de 50 % do potencial osmótico total em glicófitas crescendo em ambientes salinos naturais (Ashraf, 1994). Alguns autores observam que a sacarose pode ser utilizada para o ajustamento osmótico (Koyro, 2006), o que foi verificado em plantas de arroz, trigo e soja e algodoeiro (Kafi *et al.*, 2003).

Os efeitos tóxicos específicos dos sais para as plantas incluem, entre outros, a interferência com a captação e transporte de nitrato, metabolismo de proteínas, interferência com o transporte de íons essenciais, redução na taxa de fotossíntese, necrose foliar e redução na produtividade (Lewis *et al.*, 1989; Tester & Davenport, 2003).

O sódio (Na^+) é um elemento funcional, ou seja, pode substituir parcialmente um elemento essencial em processos metabólicos essenciais. Pelo fato do Na^+ ser semelhante ao potássio (K^+), tanto física, quanto quimicamente e existir em plantas tolerantes à salinidade, que utilizam o Na^+ no seu metabolismo ao invés do K^+ , foi sugerido que o Na^+ pode substituir o K^+ em funções metabólicas, tais como: ajustamento osmótico e controle da abertura estomática (Subbarao *et al.*, 2003). A toxicidade do Na^+ é resultante dessa mesma capacidade de competir com o K^+ por alguns sítios de ligação em reações essenciais para o funcionamento celular.

Contudo, esse elemento não é capaz de substituir o K^+ em todas as funções, como por exemplo, na ativação de mais de 50 enzimas. Assim, em tecidos com concentrações elevadas de Na^+ ou com uma elevada relação Na^+/K^+ pode haver interrupção de vários processos metabólicos no citoplasma (Tester & Davenport, 2003).

A redução da taxa de crescimento foliar pode representar uma resposta adaptativa ao estresse salino, uma vez que o aumento de sais no solo dificulta a absorção de água pela planta (Carillo *et al.*, 2005) e a redução na área foliar limita as perdas de água por transpiração (Neumann, 1997). Dessa forma é provável que sob salinidade a massa foliar específica, dada pela razão: massa seca foliar / área foliar, aumente.

Outra adaptação à salinidade é o aumento da suculência devido ao aumento da espessura foliar, que visa evitar o déficit hídrico (Greenway & Munns, 1980) e reduzir a concentração de sais no protoplasma (Ghoulam *et al.*, 2002). Foi observado que o conteúdo de água diminuiu em plantas de beterraba (Ghoulam, *et al.*, 2002), tomateiros (Bolarín, *et al.*, 1995) e plantas de soja (El-Samad & Shaddad, 1997) cultivados sob salinidade.

O maior crescimento das raízes em relação à parte aérea tem sido considerado uma adaptação morfológica relacionada aos estresses hídrico e salino (Creelman *et al.*, 1990; Saab *et al.*, 1990; Ferreira, 2005) devido ao aumento da área de absorção de água e nutrientes, prevenindo deficiência mineral e desidratação (Okusanya, 1977). Em plantas de *Plantago marítima* L., uma planta halófito, houve aumento do comprimento das raízes sob salinidade (Rubinigg *et al.*, 2003). Essa (2002) verificou uma redução significativa na altura de plantas de soja submetidas ao estresse salino.

O nitrato é a principal fonte de nitrogênio para as plantas cultivadas (Silveira *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002). A salinidade reduz a captação de nitrato (Rubinigg *et al.*, 2003) e, conseqüentemente a assimilação de nitrogênio (Silveira *et al.*, 2001) necessário à síntese protéica.

Sob estresse salino o conteúdo de proteínas decresce na maioria das espécies vegetais (Misra *et al.*, 1997; Evers *et al.*, 1997) como foi verificado em plantas de cevada, de girassol e de arroz (Ashraf & Harris, 2004). Isso ocorre porque há uma redução na síntese protéica e aumento na proteólise (Silveira *et al.*, 2003), devido ao aumento da atividade de proteases (Evers *et al.*, 1997). A síntese protéica diminui pelo aumento do Na⁺ (Costa *et al.*, 2003), uma vez que o mesmo compete com o K⁺ (Subbarao *et al.*, 2003; Tester & Davenport, 2003) e a síntese protéica depende de elevadas concentrações de K⁺ para ocorrer, pois esse elemento é necessário para ligar o RNA transportador aos ribossomos. Com o aumento da proteólise há acréscimo na concentração de aminoácidos livres totais (Silveira *et al.*, 2003; Ashraf & Harris, 2004).

Puiatti & Sodek (1999) mostraram que há mudanças drásticas no tipo e concentração de aminoácidos transportados quando plantas de soja são submetidas a alguns tipos de estresse. Bouché *et al.* (2003) afirmaram que o GABA aumenta sob estresses abióticos e bióticos. Em plantas mantidas sob hipoxia há um aumento na concentração dos aminoácidos GABA, ALA (Reggiani *et al.*, 1988; Puiatti & Sodek, 1999; Souza & Sodek, 2003), PRO (Reggiani *et al.*, 1988), GLY e SER (Souza & Sodek, 2003) na seiva do xilema.

Sob estresse hídrico há acúmulo de PRO e amidas (Ashraf & Harris, 2004). Algumas amidas também acumulam em plantas submetidas ao estresse salino (Ashraf & Harris, 2004). As concentrações de ASN também aumentam

freqüentemente em resposta a esse estresse, como observado em *Agrostis stolonifera*, que apresentou maior acúmulo de ASN do que de PRO na seiva do xilema (Ashraf & Harris, 2004).

Em plantas de cevada, submetidas ao estresse salino, houve o aumento de ASN nas raízes e na seiva do xilema e aumento de GLN nas raízes (Ashraf & Harris, 2004). Pérez-Alfocea *et al.* (1994) e Bolarín *et al.* (1995) verificaram aumento do GABA em folhas, calos e raízes de tomateiros submetidos ao estresse salino.

Correlações positivas entre aumento da concentração de PRO e aumento na tolerância ao estresse salino foram observadas em plantas de trigo (Kafi *et al.*, 2003), de amendoim (Jain *et al.*, 2001), de arroz (Basu *et al.*, 2002), de eucalipto (Woodward & Bennett, 2005) e de *Phaseolus aureus* (Misra & Gupta, 2005). Além de seu papel como soluto compatível, outras funções atribuídas à PRO na adaptação ao estresse salino, são: evitar a desnaturação de macromoléculas, seqüestrar radicais hidroxilas e estabilizar membranas (Rudolph *et al.*, 1986; Jain, *et al.*, 2001; Ehsanpour & Fatahian, 2003; Silveira *et al.*, 2003; Misra & Gupta, 2005; Woodward & Bennett, 2005). Contudo o papel da PRO no ajustamento osmótico de plantas sob salinidade não está totalmente esclarecido e, segundo alguns autores, varia de acordo com a espécie (Jain *et al.*, 2001; Ghoulam *et al.*, 2002; Kafi *et al.*, 2003; Ehsanpour & Fatahian, 2003; Silveira *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2003; Ashraf & Harris, 2004; Misra & Gupta, 2005). A concentração desse aminoácido não aumentou em plantas de beterraba (Ghoulam *et al.*, 2002), de arroz (Demiral & Türkan, 2005) e em *Arabidopsis thaliana* (Liu & Zhu, 1997) em presença de NaCl.

Alguns autores consideram que o acúmulo de PRO seja mais uma consequência do estresse do que uma característica importante na tolerância ao estresse (Liu & Zhu, 1997).

A família Leguminosae possui cerca de 17.500 espécies, constituindo-se em uma das mais numerosas dentre as dicotiledôneas. Sua distribuição abrange o mundo todo, em particular em regiões tropicais e subtropicais. As leguminosas têm grande importância econômica. Compreendem desde plantas agrícolas usadas tanto na alimentação humana quanto animal e, ainda, usadas para o acréscimo de nitrogênio nos solos, até aquelas que fornecem matérias-primas para indústrias química, farmacêutica e madeireira (Moreira, 1997).

As leguminosas usadas na alimentação constituem-se em importante fonte de proteína, carboidratos e vitaminas na dieta de várias populações, especialmente nos países em desenvolvimento (Phillips & McWatters, 1991).

Dentre as leguminosas usadas na alimentação destaca-se a soja, cuja importância econômica do cultivo no país é bem conhecida, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais desta leguminosa (Lima, 2002). Existem alguns autores que a consideram moderadamente tolerante ao estresse salino (An *et al.*, 2001). Contudo há uma grande diversidade nas respostas das diversas cultivares dessa espécie à salinidade (Wang & Shannon, 1999; Lee *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

Verificar as alterações no crescimento e metabolismo de plantas de soja, submetidas a diferentes concentrações de NaCl.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Plantas de soja, *Glycine max* (L.) Merr., cv. IAC 17, não inoculadas, foram cultivadas em casa de vegetação nos meses de fevereiro e março de 2004, durante 45 dias, sob luz natural e temperaturas que variaram de 23 a 29 °C.

3.1.1. Exposição das plantas de soja ao estresse salino

Em vasos plásticos de 1,5 L contendo perlita foram cultivadas duas plantas.

Os vasos, mantidos sobre pratos plásticos, foram irrigados diariamente com água de torneira, até que as plantas atingissem o estágio V1 (Fehr *et al.*, 1971), quando ocorre a perda dos cotilédones. A partir dessa fase, as plantas foram nutridas, duas vezes por semana, com 250 mL de solução nutritiva completa de Hoagland & Arnon (1950). À solução nutritiva foi acrescentado NaCl, gradativamente, de 50 em 50 mM, a fim de permitir a adaptação gradual das plantas ao sal e evitar um choque osmótico (Okusanya & Oyesiku, 1994; Haddad & Mazzafera, 1999; Hasegawa & Bressan, 2000), até que as concentrações finais de 50 mM, 100 mM e 200 mM de NaCl fossem atingidas. Nas aplicações das soluções, a exposição uniforme das raízes ao sal foi assegurada pelo encaixe dos vasos furados dentro de vasos sem furos e vazios. Dessa forma, a solução subiu por capilaridade, preenchendo o vaso até a superfície da perlita. Embora os vasos tenham sido mantidos úmidos, eles não permaneceram alagados, não tendo sido evidenciadas, a olho nu, alterações morfológicas externas, nem variação no diâmetro dos caules, que caracterizassem formação de aerênquima, o que indicaria hipoxia para as plantas.

Entre as aplicações de solução nutritiva, acrescida ou não de sal, o substrato foi lavado com água de torneira para evitar o acúmulo de sais e deixadas por 24 horas sem o vaso sem furos, para que a drenagem da água fosse eficiente e não houvesse uma diluição posterior da solução nutritiva.

3.2. Medida dos parâmetros de crescimento

3.2.1. Altura da parte aérea e comprimento das raízes

Foram obtidas as medidas da altura da parte aérea, do colo da raiz até a gema apical e do comprimento da raiz principal, do colo à coifa. A razão entre o comprimento das raízes e a altura da parte aérea também foi calculada.

3.2.2. Área foliar

A área foliar foi determinada utilizando-se medidor da marca LI-COR, modelo LI-3100.

3.2.3. Massa fresca

As massas frescas foram obtidas em balança analítica da marca Marte, modelo AL500.

3.2.4. Massa seca

As massas secas foram determinadas em balança analítica da marca Marte, modelo AL500, após o material vegetal permanecer em estufa com ventilação forçada a 80°C, por 72 horas. Também foram calculadas a razão entre as massas

secas das raízes e parte aérea e a massa foliar específica ($M_{fe} = MS_{foliar} / A_{foliar}$), onde MS_{foliar} = massa seca das folhas e A_{foliar} = área foliar.

3.2.5. Massa seca livre de cinzas

As massas secas livres de cinzas foram calculadas com a finalidade de verificar o valor real de biomassa, descontado de um possível acúmulo de sal. Após a determinação da massa de matéria seca, o material foi colocado em mufla a 500°C, por oito horas. A massa das cinzas foi obtida utilizando-se balança analítica da marca OHAUS, modelo Analytical Plus. A massa das cinzas foi subtraída da massa de matéria seca anteriormente determinada.

3.2.6. Conteúdo de água

O conteúdo de água foi calculado a partir da subtração da massa seca do valor da massa fresca e o resultado dividido pela massa seca.

3.3. Medida dos parâmetros bioquímicos

3.3.1. Dosagem de proteínas nas folhas

Foram coletadas amostras de folhas totalmente expandidas, das quais utilizou-se 400 mg de cada amostra, macerados com nitrogênio líquido e transferidos para frascos âmbar com 4 mL de NaOH a 0,1 N, por 24 h. O extrato foi centrifugado a 1.200 g, durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem de proteínas segundo o método estabelecido por Bradford (1976). A leitura das absorvâncias foi realizada em 595 nm em espectrofotômetro UV/VIS da marca FEMTO, modelo 600.

3.3.2. Extração de metabólitos das raízes

As raízes foram lavadas e o excesso de água retirado com papel absorvente. A seguir, foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas em almofariz com o pistilo. O material foi colocado em tubos de polipropileno, extraído com metanol: clorofórmio: água (MCW), na proporção de 12:5:3 (Bielecki & Turner, 1966) e mantido a 5°C por 24 horas. A seguir, o extrato foi centrifugado a 2.000 g, por 30 minutos, em centrífuga da marca FANEM modelo 215. O sobrenadante foi recuperado em proveta e, para cada 4 mL, foi acrescentado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água. Agitou-se a mistura. Após repouso de 24 horas, as fases estavam separadas. A fase clorofórmica foi descartada e a fase aquosa foi aquecida em banho-maria a 38°C por 8 horas, para eliminação do resíduo de clorofórmio e concentração da amostra. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 5 minutos, em centrífuga BECKMANN, modelo Avanti™ J-30I, recuperando-se o sobrenadante. As amostras foram armazenadas a -20°C e usadas para a dosagem de nitrato, açúcares solúveis totais e aminoácidos livres totais.

3.3.3. Dosagem de nitrato (NO_3^-) nas raízes

A determinação de NO_3^- foi baseada no método descrito por Cataldo *et al.* (1975). A leitura das absorvâncias foi realizada em 410 nm, em espectrofotômetro UV/VIS da marca FEMTO, modelo 600.

3.3.4. Dosagem de açúcares solúveis totais nas raízes

O método utilizado para a dosagem de açúcares solúveis totais nas raízes foi o de fenol sulfúrico, descrito por Dubois *et al.* (1956). Foram pipetados 50 μL de amostra, ou de água deionizada (branco) ou dos padrões (solução de sacarose), em

tubos de ensaio. Foram acrescentados 450 µL de água deionizada, 500 µL de reagente fenólico a 5 % e 2 mL de H₂SO₄ concentrado. Agitou-se cuidadosamente. Após atingir a temperatura ambiente, as absorvâncias foram medidas em 490 nm, em espectrofotômetro UV/VIS da marca FEMTO, modelo 600.

3.3.5. Dosagem de aminoácidos solúveis totais nas raízes

Os aminoácidos foram determinados segundo Moore & Stein (1948). Foram pipetados 50 µL de amostra, ou de água deionizada (branco) ou dos padrões (soluções de LEU), em tubos de ensaio. Foram acrescentados 950 µL de água deionizada, 500 µL de tampão citrato 0,2 M, pH 5,0 e 200 µL de ninhidrina a 5 % e 1000 µL de KCN 0,01 M a 2 %, diluídos em éter monometílico de etilenoglicol. Cobriu-se cada tubo com bolinha de vidro, agitou-se e incubou-se em banho-maria a 100°C por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos para o escuro. Após atingir a temperatura ambiente, completou-se o volume para 4 mL com etanol a 60 %. As absorvâncias foram medidas em 570 nm, em espectrofotômetro UV/VIS, da marca FEMTO, modelo 600.

3.3.6. Coleta da seiva do xilema

A coleta da seiva do xilema foi realizada segundo McClure & Israel (1979). O caule foi seccionado na região abaixo do nó cotiledonar, com o auxílio de uma lâmina de barbear. O exsudato foi coletado com o auxílio de microcapilares e armazenado em tubos do tipo eppendorf, mantidos em banho de gelo. As amostras foram congeladas para análises posteriores.

3.3.7. Separação e análise da composição de aminoácidos livres na seiva do xilema por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A separação dos aminoácidos por HPLC foi realizada em coluna de fase reversa, após derivação com orto-ftaldialdeído (OPA), segundo Jarret *et al.* (1986) e 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl), conforme Nasholm *et al.* (1987).

Utilizou-se um cromatógrafo, da marca LKB, modelo 2150, com duas bombas controladas por um gerador de gradiente da marca LKB, modelo 2152.

Os solventes utilizados na formação do gradiente de eluição, pelo sistema envolvendo a derivação com OPA, foram:

- Solvente da bomba “A”: tampão fosfato ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), pH 7,25 a 50 mM + tetrahidrofurano a 20 mL/L + metanol a 20 mL/L.
- Solvente da bomba “B”: metanol 65 %.

O reagente OPA-borato foi preparado da seguinte forma: foram dissolvidos 50 mg de OPA em 1 mL de metanol, que, em seguida, foram misturados com 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 (2,4 g de ácido bórico em 90 mL de água, pH ajustado com NaOH a 2 N). A solução foi filtrada (filtro Millipore, em PVD de 0,45 μm). Para a derivação, 5 μL de mercaptoetanol foram adicionados a 625 μL da mistura.

As amostras da seiva do xilema foram centrifugadas a 14.000 g por 2 min, para posterior derivação com a mistura OPA-borato + mercaptoetanol.

Uma alíquota de 20 μL de amostra, ou padrão, foi misturada com 60 μL do reagente OPA-borato + mercaptoetanol em tubo do tipo eppendorf, agitando-se manualmente. Após 2 min, a derivação do reagente com os aminoácidos foi concluída e uma alíquota de 10 μL dessa mistura foi injetada no HPLC. A seguir, iniciou-se a corrida cromatográfica, pela eluição da mistura em gradiente dos

solventes das bombas “A” e “B” através da coluna cromatográfica (Waters Spherisorb ODS-2, 5 μ m, 4,6 mm x 250 mm, da SUPELCO INC.). Fixou-se um gradiente de: 25 - 60 % de “B” entre 0 e 35 min, 60 - 75 % de “B” entre 35 e 45 min, 75 - 95 % de “B” entre 45 e 60 min e 95 - 100 % de “B” entre 60 e 65 minutos.

Ao passar pela coluna os derivados aminoácidos-OPA foram detectados pelo monitor de fluorescência Shimadzu, modelo RF-530, ajustado com comprimento de onda de 250 nm de excitação e 480 nm de emissão. O registro da área e do tempo de retenção de cada derivado foi feito pelo integrador da marca LKB, modelo 2221.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de um padrão Sigma AAS 18, constituído por 15 aminoácidos (ASP, GLU, SER, HIS, GLY, THR, ARG, ALA, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS), aos quais foram adicionados ASN, GLN e GABA, todos na concentração de 250 nmol/mL (fig. 1), diluído 20 vezes em água.

Os sistemas de derivação podem apresentar dificuldades em separar determinados aminoácidos (Mosquim & Sodek, 1992). Por esse motivo, utilizou-se a derivação com FMOC-Cl para evidenciar o aminoácido PRO.

O equipamento utilizado foi o mesmo descrito anteriormente. As alterações ocorreram nos solventes e gradiente de eluição, nos λ de excitação (263 nm) e emissão (313 nm) e no processo de derivação.

Na derivação com FMOC-Cl, os solventes utilizados na formação do gradiente de eluição foram:

- Solvente da bomba “A”: tampão HAc 3 % + trietilamina 0,1 %, pH 3,0;
- Solvente da bomba “B”: metanol a 100 %.

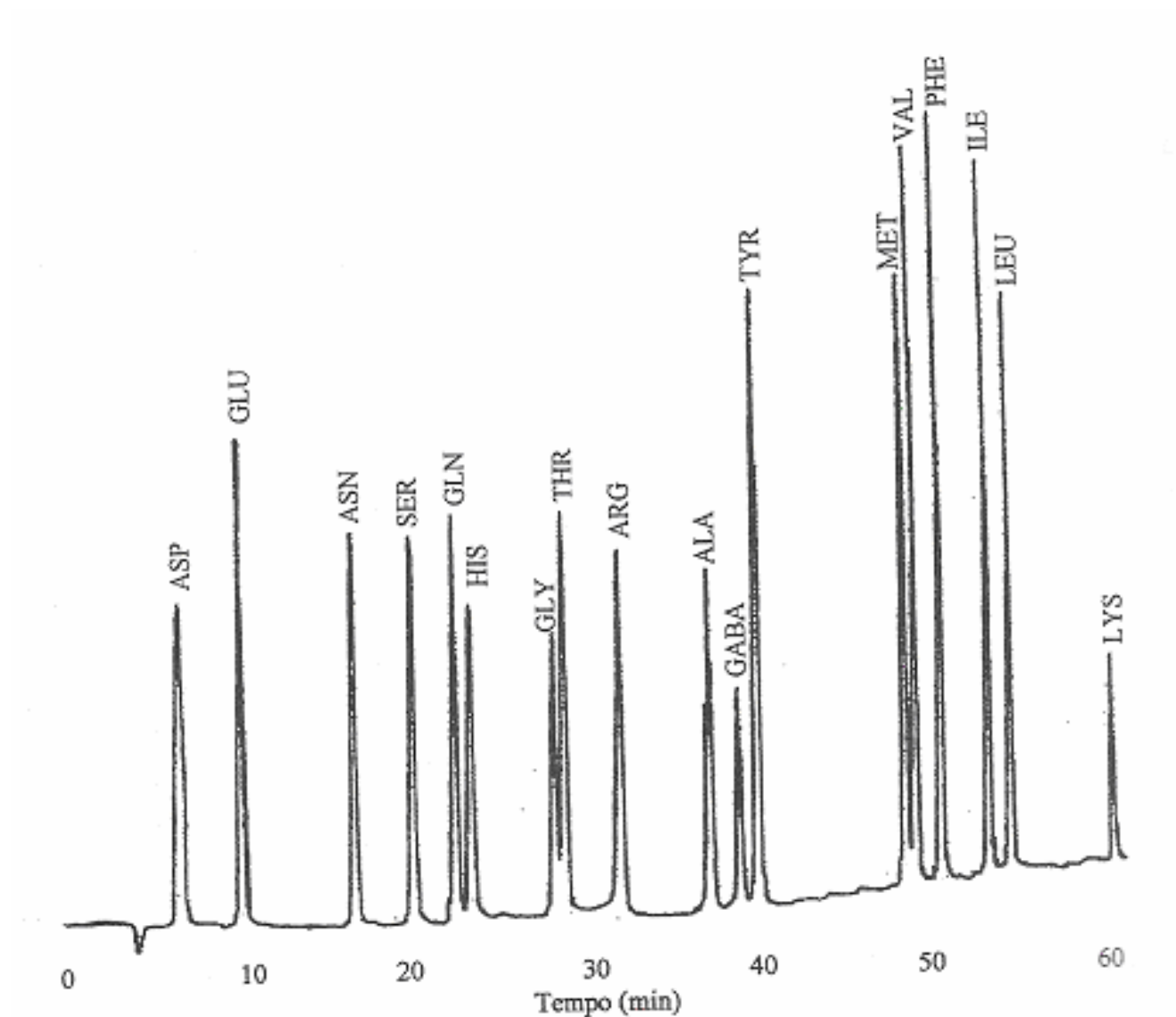


Figura 1. Perfis de eluição de derivados OPA-aminoácidos do padrão Sigma ASS-18, enriquecido com ASN, GLN e GABA, em coluna cromatográfica Spherisorb ODS-2 (5 μ m, 4,6 mm x 250 mm), em HPLC. Taxa de fluxo: 0,8 mL/min, λ de excitação: 250 nm, λ de emissão: 480 nm, solvente da bomba "A": Na_2HPO_4 50 mM e pH 7,25, solvente da bomba "B": metanol a 65 %, gradiente, ver texto.

Fixou-se um gradiente de: 45 - 60 % de “B” entre 0 e 5 min, 60 - 85 % de “B” entre 5 e 55 min, 85 -100 % de “B” entre 55 e 56 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹.

O reagente FMOC-Cl a 15 mM foi preparado dissolvendo-se 38,7 mg de FMOC-Cl em 10 mL de acetona. Preparou-se o tampão borato-NaOH, pH 6,3, misturando-se 6,18 g de ácido bórico em 100 mL de água deionizada, pH ajustado com NaOH a 1 N. A solução foi filtrada (filtro Millipore, em PVD de 0,45 µm). Para a derivação, uma alíquota de 100 µL da amostra foi misturada com 25 µL de tampão borato, pH 6,3 e 125 µL do reagente FMOC-Cl 15 mM. Após 40 segundos foram adicionados 500 µL de pentano. Agitou-se a mistura e removeu-se o pentano com uma pipeta Pasteur. O processo de extração com pentano foi repetido, deixando-se evaporar o restante do solvente.

Após diluir uma alíquota da amostra 5 vezes com água deionizada, foram injetados 10 µL no cromatógrafo.

3.3.8. Quantificação dos aminoácidos livres totais na seiva do xilema

A quantidade de aminoácidos livres totais na seiva do xilema foi determinada pela somatória das áreas de todos os picos integrados, detectados no cromatograma, conforme descrito no item 3.3.7.

3.4. Delineamento experimental e análise estatística

Os tratamentos dos ensaios foram dispostos em delineamento experimental casualizado, com 10 replicações, onde cada vaso com duas plantas compôs a unidade experimental. Aos dados quantitativos obtidos, aplicou-se a análise de variância e, nos casos significativos, foram comparadas as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da salinidade no crescimento

A salinidade não alterou o comprimento das raízes das plantas de soja (fig. 2), porém houve um decréscimo de 15,5 %, 25,8 % e 34,0 % no comprimento da parte aérea nas plantas tratadas com 50 mM, 100 mM e 200 mM de NaCl, respectivamente (fig. 2).

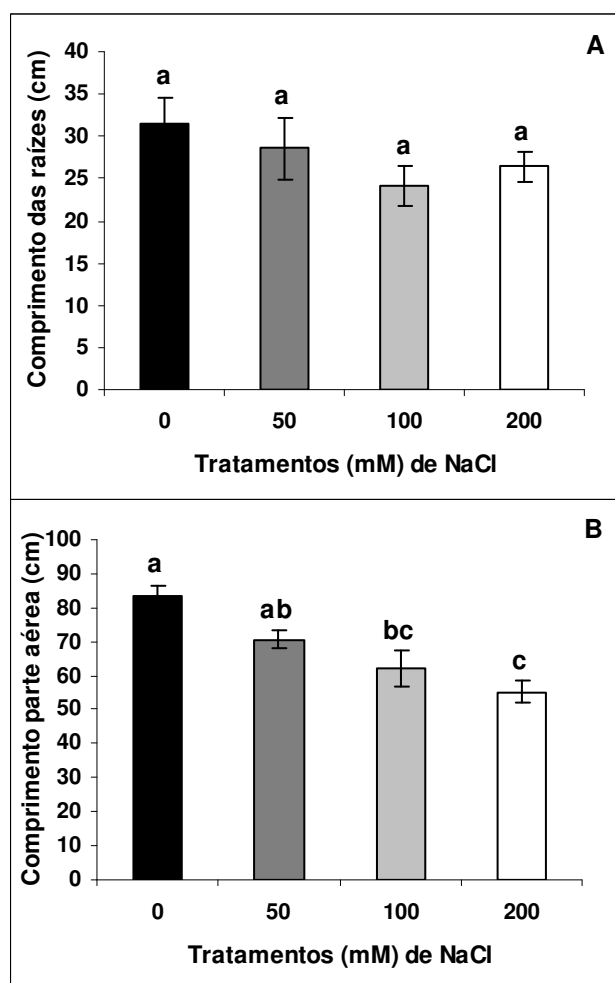


Figura 2. Comprimento das raízes (A) e parte aérea (B) de plantas de soja após tratamento em diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 %.

Não houve uma diferença significativa entre os tratamentos, da medida da razão comprimento de raiz / comprimento da parte aérea, com o aumento da salinidade (fig. 3).

Observou-se um decréscimo gradativo na área foliar com o aumento da salinidade. Em relação ao controle, as quedas foram de 25,6 % (50 mM), 42,9 % (100 mM) e 57,1 % (200 mM) (fig. 4).

As massas frescas apresentaram decréscimos expressivos, com o incremento de NaCl no meio de cultivo nas folhas e caules (fig. 5 A e B) mas mantiveram-se constantes nas raízes (fig. 5 C).

Os valores de massas secas de folhas, caules e raízes também reduziram, em relação ao controle, com o aumento da salinidade. A redução mais expressiva ocorreu nos caules, cerca de 62 %, no tratamento de 200 mM (fig.6).

Houve um decréscimo significativo na massa seca livre de cinzas, em relação ao controle, nos tratamentos com 100 e 200 mM de NaCl em todos os órgãos (fig.7).

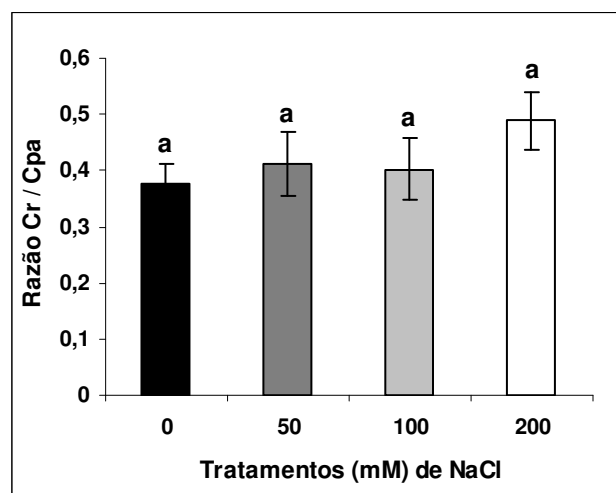


Figura 3. Razão comprimento da raiz (Cr) / comprimento da parte aérea (Cpa) de plantas de soja, após tratamento em diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 %.

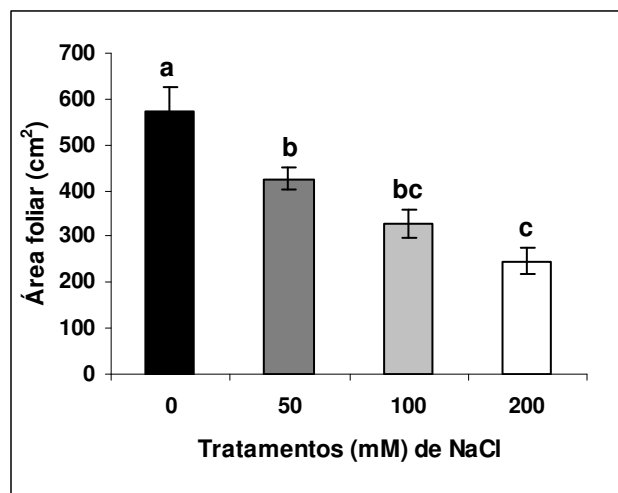


Figura 4. Área foliar de plantas de soja após tratamento em diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 %.

As razões massa seca da raiz / massa seca da parte aérea não variaram significativamente em relação ao controle, embora tenha sido observado um aumento de 30,0 % nas plantas tratadas com 200 mM de NaCl (fig.8).

Não ocorreram variações significativas na massa foliar específica das plantas tratadas em relação ao controle (fig.9).

Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de água da parte aérea das plantas expostas ao tratamento salino em relação ao controle (fig.10). No entanto, o conteúdo de água das raízes de plantas tratadas com sal aumentou significativamente em relação ao controle.

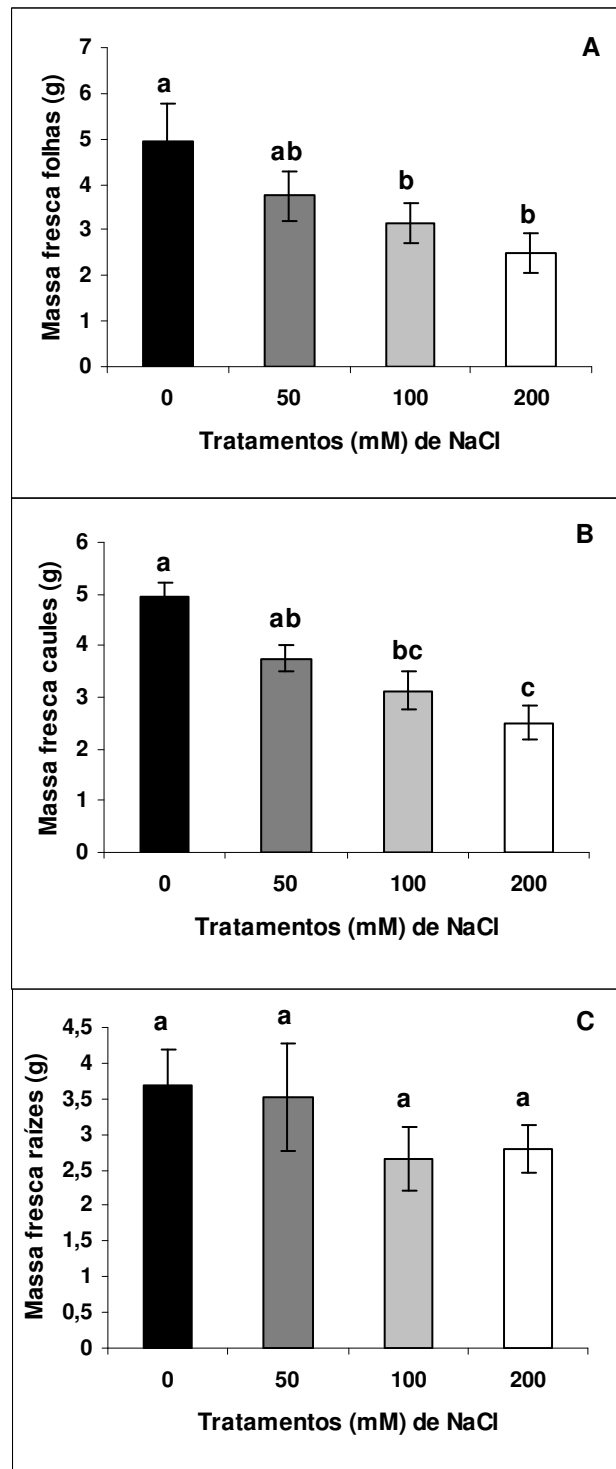


Figura 5. Massas frescas das folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 %.

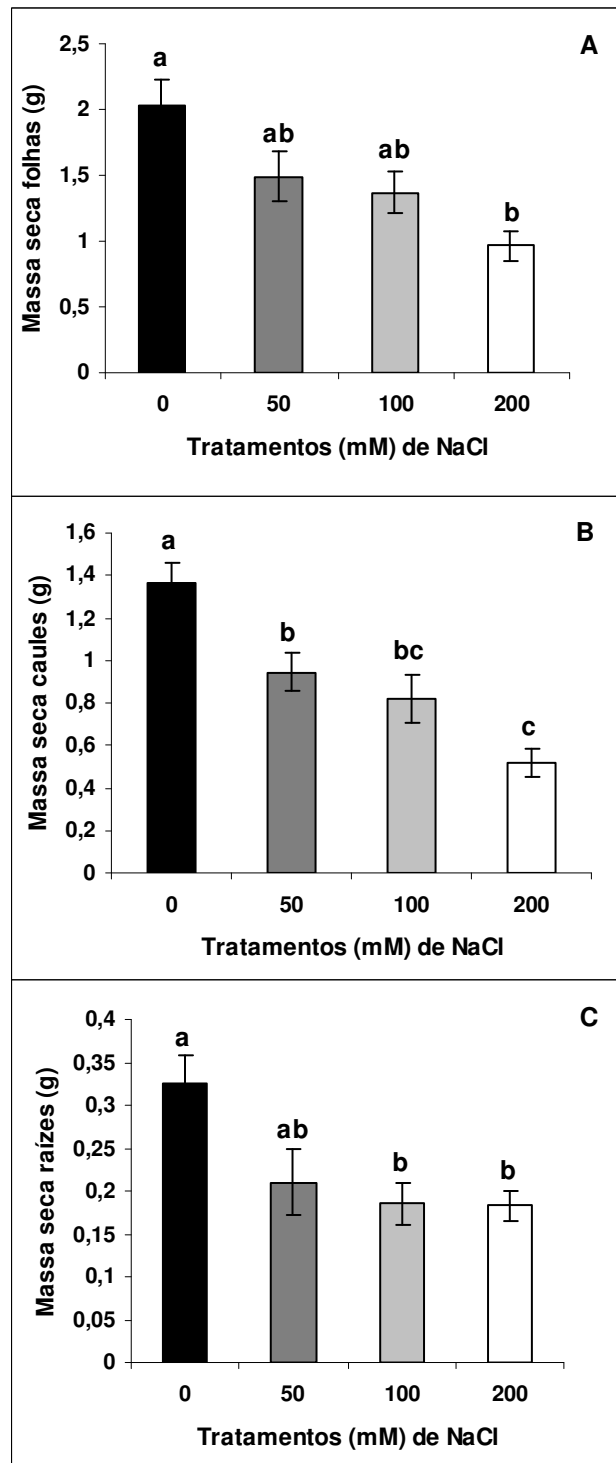


Figura 6. Massas secas de folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 %.

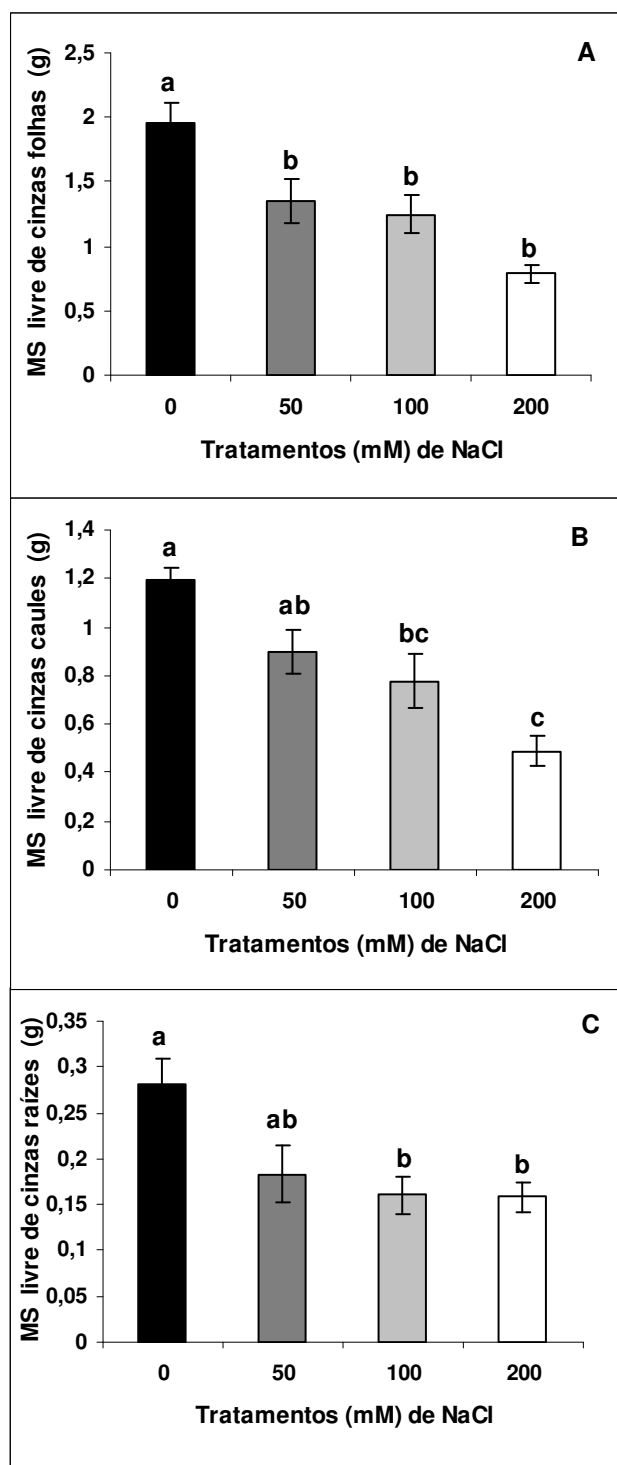


Figura 7. Massas secas (MS) livre de cinzas de folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 %.

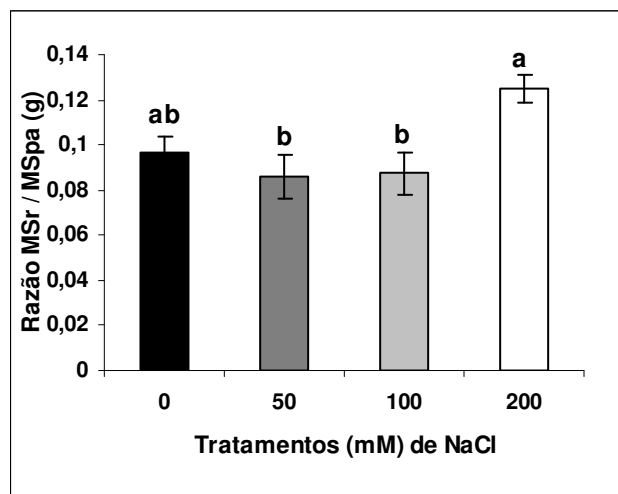


Figura 8. A razão massa seca das raízes (MSr) / massa seca da parte aérea (MSpa) de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 %.

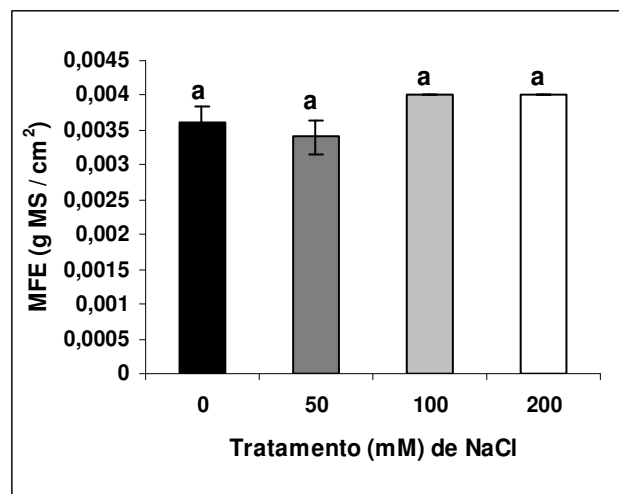


Figura 9. Massa foliar específica (MFE) de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 % (MS = massa seca).

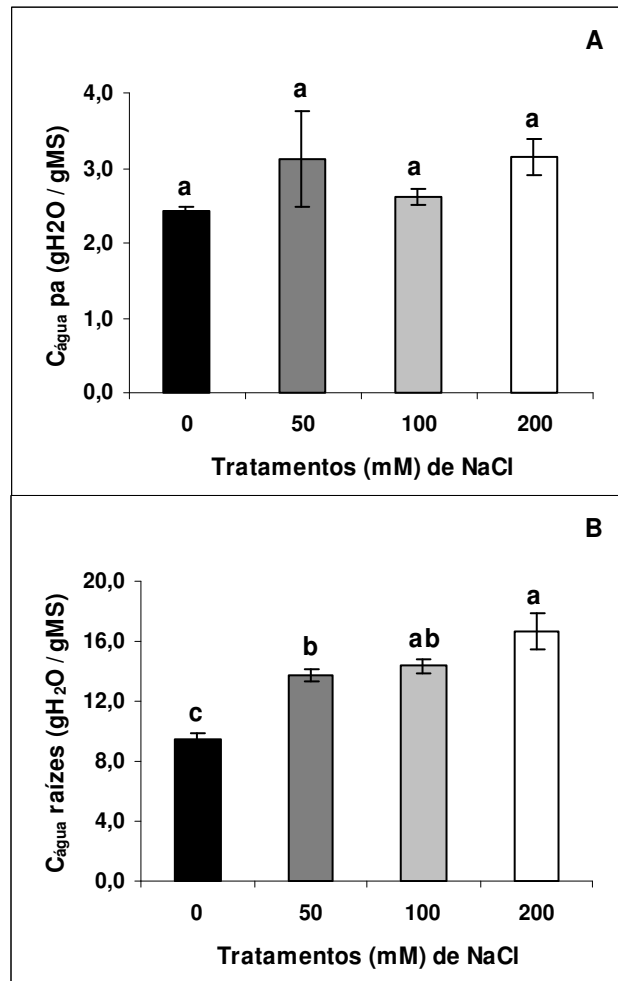


Figura 10. Conteúdo de água da parte aérea ($C_{\text{água pa}}$) (A) e raízes ($C_{\text{água raízes}}$) (B) de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 % (MS = massa seca).

4.2. Efeito da salinidade em parâmetros bioquímicos

O teor de proteínas em folhas de plantas de soja não foi alterado significativamente pela salinidade, em relação ao controle (fig.11).

Observou-se uma expressiva queda do nitrato nas raízes, sob influência do NaCl. No tratamento mais brando, de 50 mM, obteve-se uma diminuição de 72,1 %, seguida de 80,8 % e 83,3 % para os tratamentos em que foram utilizadas maiores concentrações de sal (100 mM e 200 mM) (fig.12).

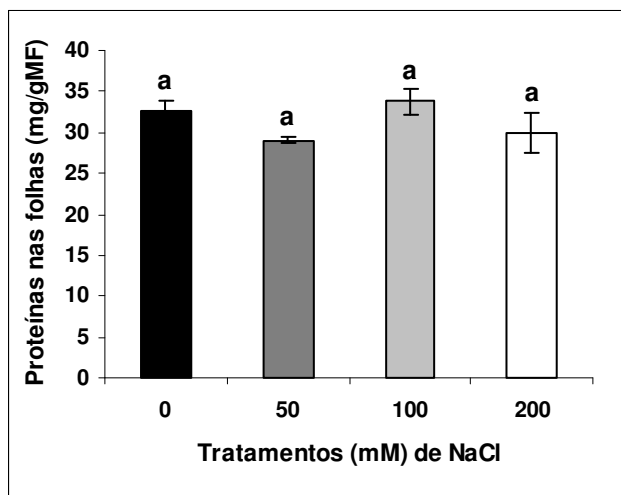


Figura 11. Proteínas nas folhas de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 % (MF= massa fresca).

Não há uma relação clara entre a concentração de açúcares solúveis totais nas raízes e a concentração de NaCl no meio de cultivo, já que houve uma queda muito expressiva apenas quando as plantas foram expostas à concentração de 100 mM de NaCl (56,9 %) (fig.13).

A concentração de aminoácidos solúveis totais nas raízes diminuiu quando as plantas foram submetidas às diversas concentrações salinas (fig.14).

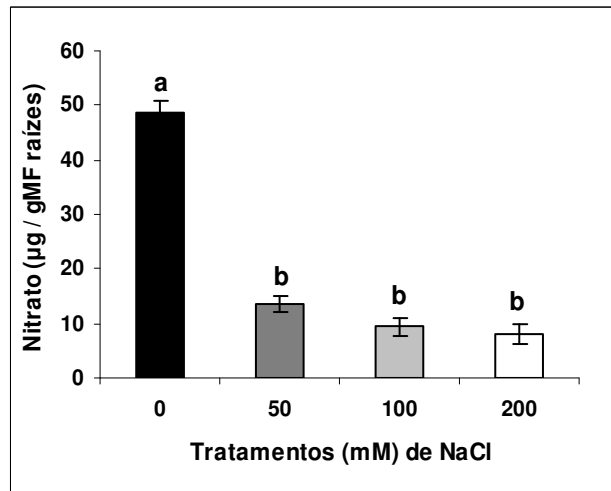


Figura 12. Nitrato em raízes de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 % ($MF_{raízes}$ = massa fresca das raízes).

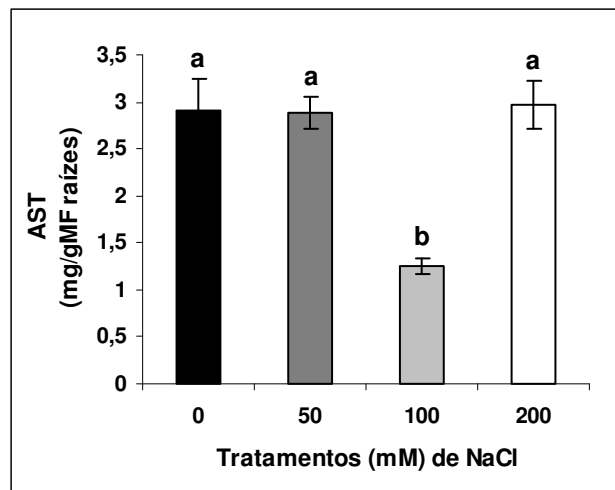


Figura 13. Açúcares solúveis totais (AST) em raízes de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 % ($MF_{raízes}$ = massa fresca das raízes).

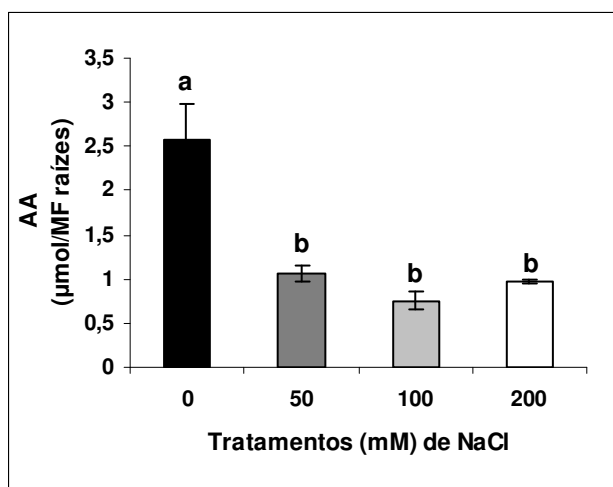


Figura 14. Aminoácidos (AA) solúveis totais em raízes de plantas de soja após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. As barras indicam o erro padrão da média. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos, segundo Tukey a 5 % ($MF_{raízes}$ = massa fresca das raízes).

As proporções entre os aminoácidos livres no exsudato do xilema e nas raízes de plantas de soja submetidas ao estresse salino são apresentadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente. No controle, os aminoácidos que foram encontrados na seiva em maior proporção foram ASN, GABA e ASP, respectivamente. Com exceção da ASN, houve aumento na concentração de todos os aminoácidos no exsudato do xilema de plantas submetidas aos tratamentos com solução salina, sendo que SER, ALA, GABA e PRO foram os que apresentaram maior acréscimo (tabela 1).

Nas raízes, os aminoácidos que apresentaram a maior proporção no controle foram ASN, GABA e GLU, respectivamente e após a adição de sal ao meio a concentração do aminoácido ASN diminuiu enquanto SER e GABA aumentaram (tabela 2).

Tabela 1. Proporção (mol %) entre os aminoácidos livres (AA) no exsudato do xilema de plantas de soja, submetidas a estresse salino.

AA*	Controle	50 mM	100 mM	200 mM
ASP	1,12	2,25	3,62	1,49
ASN	88,84	60,41	57,53	60,26
SER	0,87	9,21	8,96	5,12
ALA	0,70	9,20	9,40	11,25
GABA	1,34	2,62	2,15	3,76
PRO**	0,74	3,52	7,72	4,68
OUTROS*	6,39	12,79	10,62	13,44

*Foram detectados os aminoácidos GLU, GLN, HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém a soma das concentrações era inferior a 3 %. PRO** identificada com a derivação por FMOC.

Tabela 2. Proporção (mol %) entre os aminoácidos livres (AA) nas raízes de plantas de soja, submetidas a estresse salino.

AA*	Controle	50 mM	100 mM	200 mM
ASP	1,81	6,26	3,13	2,73
GLU	2,88	5,96	3,28	3,12
ASN	79,39	51,61	65,34	67,68
SER	1,61	4,32	3,38	4,25
HIS	2,25	1,59	2,44	3,04
TYR	1,70	4,03	3,15	2,17
GABA	4,76	16,51	11,92	8,58
OUTROS*	5,60	9,72	7,36	8,43

*Foram detectados os aminoácidos GLN, GLY, THR, ARG, ALA, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém a soma das concentrações era inferior a 3 %.

5. DISCUSSÃO

A avaliação da sensibilidade das plantas ao estresse salino é, freqüentemente, baseada nos dados de crescimento da planta (Liu & Staden, 2001).

A diminuição do comprimento da parte aérea encontrada em soja, neste trabalho, foi observada também em plantas de *Populus tremula* (Evers *et al.*, 1997) e *Vigna vexillata* (Okusanya & Oyesiku, 1994) e coincide com o trabalho de Essa (2002), que verificou uma redução significativa da altura de plantas de soja submetidas à salinidade.

Flowers & Hajibagheri (2001) relatam que a manutenção do crescimento normal das raízes sob condições adversas de cultivo demonstra que a planta pode apresentar tolerância ao sal. Embora não se possa descartar a possibilidade da manutenção do crescimento ser devida apenas a uma adaptação da planta ao estresse salino, fato que foi observado também em cultivar sensível ao sal de *Vigna unguiculata* (Ferreira, 2005) que a suculência das raízes se manteve constante e que o comprimento das raízes aumentou quando foram submetidas às várias concentrações de sal. Neste trabalho a análise dos parâmetros de crescimento revelou que as raízes de plantas de soja são menos afetadas pelo sal que a parte aérea. O comprimento das raízes e a massa fresca das raízes não foram reduzidos significativamente com o aumento na concentração de sal. O conteúdo de água nas raízes, com base na massa seca, aumentou sob salinidade. Alguns autores consideram que o acúmulo de água nas células está relacionado com a maior tolerância ao estresse salino (Greenway & Munns 1980; Costa *et al.*, 2003), pois, desta forma, a planta conseguiria diminuir a concentração de sais no citoplasma (Ghoulam *et al.*, 2002). Zenoff *et al.* (1994) relatam que as raízes podem ser menos

afetadas pelo sal do que a parte aérea, devido à alterações na proporção entre os lipídios, que ocorrem exclusivamente nas membranas de células das raízes, preservando a sua fluidez.

A redução da área foliar observada neste trabalho também foi observada em várias plantas submetidas ao estresse salino (Misra *et al.*, 1997; Ghoulam *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003; Tabatabaei, 2006). A razão dessa redução pode estar relacionada ao adiantamento da senescência foliar (Silveira *et al.*, 2003), já que sob estresse salino há acúmulo de íons nas folhas, o que acelera a abscisão das mesmas (Greenway & Munns, 1980; Tester & Davenport, 2003; Tabatabaei, 2006). Ou ainda, a diminuição da área foliar pode ser devida à redução da expansão foliar resultante da queda da pressão de turgor (Marcelis & Hooijdonk, 1999), já que sob estresse salino há uma maior dificuldade de entrada de água na planta (Lewis *et al.*, 1989; Volkmar *et al.*, 1998; Umezawa *et al.*, 2002; Carillo *et al.*, 2005).

As massas secas e massas secas livres de cinzas das plantas de soja crescendo em ambiente salino diminuíram e estes resultados coincidem com os obtidos em cajueiros (Silveira *et al.*, 2003), plantas de feijão-de-corda (Costa *et al.*, 2003), de arroz (Misra *et al.*, 1997) e plantas (El-Samad & Shaddad, 1997) e calos de soja (Liu & Staden, 2001). Dentre os fatores que podem explicar a redução da massa seca estão: a redução da fotossíntese, devido à diminuição da área foliar e a diminuição da disponibilidade de nutrientes (Marcelis & Hooijdonk, 1999), tais como a redução na concentração de NO_3 observada neste trabalho. A queda na massa fresca da parte aérea de plantas de soja pode ter ocorrido em consequência do déficit hídrico, provocado por elevadas concentrações de sal no meio externo à planta (Marcelis & Hooijdonk, 1999).

A massa foliar específica não apresentou aumento significativo e este resultado não coincide com o obtido por Wang *et al.* (2001) com plantas de soja, no qual foi observado o aumento desse parâmetro sob salinidade. Contudo, as cultivares utilizadas nos dois trabalhos foram diferentes, o que pode explicar a discrepância entre os resultados. Resultados diferentes do nosso também foram encontrados com outras espécies, nas quais a área foliar específica (recíproca da massa foliar específica) diminuiu sob estresse salino em feijoeiro (Bray & Reid, 2002; Bayuelo-Jimenez *et al.*, 2003), em plantas de pepino (Chen *et al.*, 1999) e em *Artemisia* sp. (Ishikawa & Kachi, 2000).

De forma semelhante aos resultados encontrados neste trabalho, a estabilidade na concentração de proteínas nas folhas de plantas, sob estresse salino, também foi observada por Costa *et al.* (2003) em plantas de feijão-de-corda e Ashraf (1994) em plantas de eucalipto. Embora haja aumento da proteólise sob estresse salino (Silveira *et al.*, 2003), a concentração protéica pode não ter se alterado em nosso trabalho, devido a um possível aumento na síntese de proteínas específicas de estresse (Callis, 1995; Forsyth & Shewry, 2002), que aumentam inclusive sob estresse salino, onde são observadas alterações no perfil protéico (Pedranzani *et al.*, 2003). Outra possibilidade é que o tempo experimental não tenha sido suficientemente longo para que fossem observadas alterações na concentração de proteínas.

A diminuição na concentração de aminoácidos nas raízes encontrada neste trabalho também foi observada em feijão-de-corda (Costa *et al.*, 2003). Estes resultados não coincidem com os resultados obtidos em cajueiro (Silveira *et al.*, 2003). Em diferentes cultivares de plantas de soja estudadas por El-Samad & Shaddad (1997) observou-se que em indivíduos da cultivar tolerante ao estresse

salino houve uma diminuição na concentração de aminoácidos solúveis nas raízes e nos indivíduos da cultivar sensível houve o aumento da concentração dessas substâncias.

Houve redução na concentração de nitrato nas raízes. Este fato também foi observado em cajueiro (Silveira *et al.*, 2003) e plantas de feijão-de-corda (Silveira *et al.*, 2001). Essa diminuição pode ser devida à redução da absorção de nitrato, em consequência da interferência exercida pelo Cl^- sobre alguns tipos de transportadores da membrana das células das raízes (Silveira, *et al.*, 2001; Rubinigg, *et al.*, 2003). Segundo Carillo *et al.* (2005) o Cl^- compete com o nitrato pelo sítio de ligação dos transportadores.

A diminuição na concentração de aminoácidos livres totais pode estar ligada à redução da absorção de nitrato pelas raízes (Rubinigg *et al.*, 2003; Carillo, *et al.*, 2005). Com a diminuição da absorção de nitrato há uma inibição da atividade da nitrato redutase, que é a enzima responsável pela transformação do nitrato em nitrito, passo limitante na assimilação de nitrogênio, necessário para a síntese de aminoácidos (Silveira *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002).

Muitos autores indicam a sacarose como a principal molécula de carboidrato responsável pela manutenção do turgor celular em plantas sob estresse salino (Ashraf, 1994; Hasegawa *et al.*, 2000; Kafi *et al.* 2003; Koyro, 2006). Contudo, os dados deste trabalho estão de acordo com a observação de Ashraf & Harris (2004), de que não existe um padrão evidente indicando aumento da concentração da sacarose com o aumento de sal no meio de cultivo e que o aumento ou redução da concentração da sacarose nos tecidos varia com a espécie estudada.

A ASN foi o aminoácido encontrado em maior abundância no exsudato do xilema de plantas de soja não noduladas (McClure & Israel, 1979). Puiatti e Sodek

(1999), Souza e Sodek (2003) e Thomas (2004), trabalhando com plantas de soja submetidas à hipoxia (por alagamento do sistema radicular), indicaram que a ASN é a principal forma de transporte de nitrogênio em plantas de soja, que cresceram em meio com nitrato. Esses autores também observaram redução na concentração de ASN quando as plantas foram colocadas sob estresse e discutiram a possibilidade da diminuição da sua concentração ter ocorrido devido à interconversão deste aminoácido em ALA. Nossos resultados estão de acordo com as observações desses autores, já que sob estresse salino também houve aumento de ALA.

Os aminoácidos GABA, PRO, SER e ALA apresentaram aumento de concentração na seiva do xilema, sob salinidade, o que está de acordo com observações de que esses aminoácidos estão associados aos estresses abióticos (Reggiani *et al.*, 1998; Puiatti & Sodek, 1999; Bouché *et al.*, 2003; Souza & Sodek, 2003; Ashraf & Harris, 2004).

Segundo Thomas (2004), a síntese de GABA ocorre pela α -descarboxilação do GLU. Embora a concentração de GLU não tenha sido alterada, este aminoácido pode ter sido um intermediário na síntese de GABA em decorrência da conversão da ASN em ASP e, este último, em GLU (fig. 15).

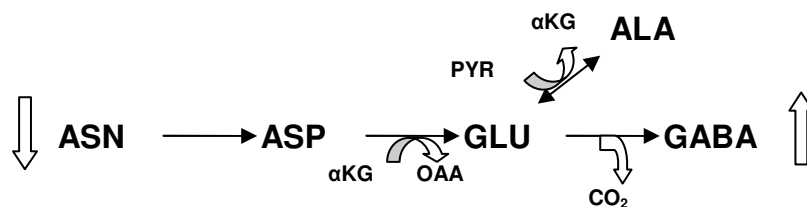


Figura 15. Precursores da síntese de ALA e GABA.

Embora alguns autores relatem que o conteúdo de PRO não pode ser utilizado como um indicador do estresse salino no caso das plantas de soja (Ashraf & Harris,

2004), Pérez-Alfocea *et al.* (1994) atribuem à PRO e ao GABA um possível papel na redução da acidificação do citosol, sob estresse salino. Neste trabalho foi encontrado um aumento na concentração de PRO, paralelamente ao aumento da salinidade. Esses resultados coincidem com os relatados para plantas de trigo (Kafi *et al.*, 2003), *P. aureus* (Misra & Gupta, 2005), plantas de amendoim (Jain *et al.*, 2001), de arroz (Basu *et al.*, 2002) e eucalipto (Woodward & Bennett, 2005). A elevação na concentração de PRO pode ser explicada por um possível aumento da síntese *de novo* deste aminoácido, sob salinidade (Silveira *et al.*, 2001), devido ao aumento da expressão da Δ^1 -pirrolino-5-carboxilato sintetase, enzima chave na via biossintética da PRO, (Liu & Zhu, 1997; Silveira *et al.*, 2003) ou pela diminuição da taxa da degradação enzimática, em consequência da inibição da PRO oxidase (Misra & Gupta, 2005).

6. CONCLUSÕES

Os açúcares solúveis não estão envolvidos na osmorregulação de plantas de soja.

Apesar do conteúdo de nitrato e aminoácidos nas raízes ter reduzido sob estresse salino, houve alterações no perfil de aminoácidos nas raízes e na seiva do xilema e aumentos nas concentrações de aminoácidos caracteristicamente relacionados a estresses, tais como PRO e GABA. Dessa forma, o cultivar IAC 17 de plantas de soja apresentou características de adaptação à salinidade, embora as elevações das concentrações desses aminoácidos não tenham sido suficientes para evitar a redução da massa seca das plantas sob salinidade.

7. LITERATURA CITADA

- An, P., Inanaga, S., Kafkafi, U., Lux, A. & Sugimoto, Y., 2001. Different effect of humidity on growth and salt tolerance of two soybean cultivars. *Biol. Plant.* 44:405-410.
- Ashraf, M., 1994. Organic substances responsible for salt tolerance in *Eurica sativa*. *Biol. Plant.* 36:255-259.
- Ashraf, M. & Harris, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166:3-16.
- Basu, S., Gangopadhyay, G. & Mukherjee, B.B., 2002. Salt tolerance in rice in vitro: Implication of accumulation of Na⁺, K⁺ and proline. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 69:55-64.
- Bayuelo-Jimenes, J.S., Debouck, D.G. & Lynch, J.P., 2003. Growth, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crop Res.* 80:207-222.
- Bielecki, R.L. & Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17:278-293.
- Bolarín, M.C., Santa-Cruz, A., Cayuela, E. & Pérez-Alfocea, F., 1995. Short-term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity. *J. Plant Physiol.* 147:463-468.
- Bouché, N., Aaron, F., Bouchez, D., Moller, S.G. & Fromm, H., 2003. Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:6843-6848.

- 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.
- Bray, S., Reid, D.M., 2002. The effect of salinity and CO² enrichment on the growth and anatomy of the second trifoliate leaf of *Phaseolus vulgaris*. *Can. J. Bot.* 80:349-359.
- Callis, J., 1995. Regulation of protein degradation. *The Plant Cell* 7:845-857.
- Carillo, P., Mastrolonardo, G., Nacca, F. & Fuggi, A., 2005. Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity. *Func. Plant Biol.* 32:209-219.
- Caltado, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., & Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitritation of salicylic acid. *Soil Sci. Plant Anal. Comm.* 6:71-80.
- Chen, G.K., Ha, G.O., Keutgein, N.; Janssens, M.J.J. & Lenz, F., 1999. The effects of NaCl salinity and CO₂ on pepino (*Solanum muticatum* Ait.) – I. Growth and yield. *Sci. Hort.* 81:25-41.
- Costa, P.H.A., Silva, J.V., Bezerra, M.A., Filho, J.E., Prisco, J. & Filho, E.G., 2003. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. *Rev. Bras. Bot.* 26:289-297.
- 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.
- Demiral, T., & Türkan, I., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Env. Exp. Bot.* 53:247-257.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Ehsanpour, A.A. & Fatahian, N., 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 73:53-56.
- El-Samad, H.M.A.B.D. & Shaddad, M.K.A., 1997. Salt tolerance of soybean cultivars. *Biol. Plant.* 39:263-269.
- Essa, A.T., 2002. Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. *J. Agron. & Crop Sci.* 188:86-93.
- Evers, D., Scmit, C., Mailliet, Y. & Hausman, J.F., 1997. Growth characteristics and biochemical changes of poplar shoots *in vitro* under sodium chloride stress. *J. Plant Physiol.* 151:748-753.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., Burmood, D.T. & Pennington, J.S., 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.). *Crop Sci.* 11:929 -931.
- Ferreira, M.C.C., 2005. Comparação do efeito do sal no crescimento e metabolismo de *Vigna unguiculata* L. Walp e *Vigna luteola* (Jacq.) Benth. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.
- Flores, P., Botella, M.A, Martínez, V. & Cerdá, A., 2002. Reponse to salinity of tomato seedlings with a split-root system: nitrate uptake and reduction. *J. Plant Nutr.* 25:177-187.
- Flowers, T.J. & Hajibagheri, M.A., 2001. Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. *Plant Soil* 231:1-9.
- Flowers, T.J., Troke, P.F. & Yeo, A.R., 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:89-121.

- Forsyth, J.L. & Shewry, P.R., 2002. Characterization of the major proteins of tubers of yam bean (*Pachyrhizus ahipa*). J. Agric. Food Chem. 50:1939-1944.
- 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.
- Greenway, H. & Munns, R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31:49-90.
- Haddad, C.R.B. & Mazzafera, P., 1999. Sodium chloride-induced leaf senescence in *Hydrocotyle bonariensis* Lam. and *Foeniculum vulgare* L.. Bras. Arch. Biol. Technol. 42:161-168.
- Hasegawa, P.M. & Bressan, R.A., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol., 51:463-499.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., 1950. The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. Sta. Bull., Circular 347.
- Ishikawa, S.I. & Kachi, N., 2000. Differential salt tolerance of two *Artemisia* species growing in contrasting coastal habitats. Ecolog. Res. 15:241-247.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S. & Sarin, N.B., 2001. Ameroliative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Rep. 20:463-468.
- Jarret, H.W., Cooksy, K.D., Ellis, B. & Anderson, J.M., 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns. Anal. Biochem. 153:189-198.
- Kafi, M., Stewart, W.S. & Borland, A.M., 2003. Carbohydrate and proline contents in leaves, roots, and apices of salt-tolerant and salt sensitive wheat cultivars. Rus. J. Plant Physiol. 50:174-182.

- Koyro, H.W., 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Env. Exp. Bot.* 56:136-146.
- Lee, G.J., Boerma, H.R., Villagarcia, M.R., Zhou, X., Carter Jr., T.E., Li, Z. & Gibbs, M.O., 2004. A major QTL conditioning salt tolerance in S-100 soybean and descendent cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 109:1610-1619.
- Lewis, O.A., Leidi, E.O. & Lips, S.H., 1989. Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. *New Phytol.* 111:156-160.
- Lima, J.D., 2002. Transporte de nitrogênio e metabolismo da ASN em soja (*Glycine max* L.) sob deficiência na assimilação do nitrogênio. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Liu, J. & Zhu, J.K., 1997. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of arabidopsis. *Plant Physiol.* 114:591-596.
- Liu, T. & Staden, J., 2001. Growth rate, water relations and ion accumulation of soybean callus lines differing in salinity tolerance under salinity stress and its subsequent relief. *Plant Growth Reg.* 34:277-285.
- Marcelis, L.F.M. & Hooijdonk, J., 1999. Effect of salinity on growth, water use and nutrient use in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil.* 215:57-64.
- McClure, P.R. & Israel, D.W., 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64:411-416.
- Misra, A.N. & Gupta, K.A., 2005. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Sci.* 169:331-339.

- Misra, A.N., Sahu, S.M., Misha, M., Singh, P., Meera, I., Das, N., Kar, M. & Sahu, P., 1997. Sodium chloride induced changes in leaf growth, and pigment and protein contents in two rice cultivars. *Biol. Plant.* 39:257-262.
- Moore, S. & Stein, W.H., 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol.Chem.* 17:367-388.
- Moreira, J.L.A., 1997. Estudo taxonômico da sub tribo Phaseolinae Benth. (Leguminosae, Papilionoideae) no sudeste e centro-oeste do Brasil. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.
- Mosquim, P.R. & Sodek, L., 1992. Partitioning of nitrogen in soybean fruit explants cultured with glutamine, asparagine or allotoin. *Plant Physiol. Biochem.* 30:451-457.
- Nasholm, T., Sandberg, G. & Ericsson, A., 1987. A quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection of their 9-fluorenylmethyl-chloroformate derivatives. *J. Chromatogr.* 396:225-236.
- Neumann, P., 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant, Cell Env.* 20:1193-1198.
- O'Leary, J.W. & Glenn, E.P., 1994. Global distribution and potential for halophytes. IN: Halophytes as a resource for livestock and rehabilitation of degraded lands (V.R. Squires and A.T. Ayoub, eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 7-17.
- Okusanya, O.T., 1977. Effect of sea water and temperature on germination behavior of *Crithmum maritimum*. *Physiol. Plant.* 41: 265-267.

- Okusanya, O.T. & Oyesiku, O., 1994. Comparative salinity tolerance of two legumes, *Vigna luteola* and *Vigna vexillata*, from the coast of Trinidad. Can J. Bot. 72:1216-1221.
- Pedranzani, H., Racagni, G., Alemano, S., Miersch, O., Ramírez, I., Pena-Cortés, H., Taleisnik, E, Machado-Domenech, E & Abdala, G., 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. Plant Growth Reg. 41:149-158.
- Pérez-Álfocea, F., Santa-Cruz, A., Guerrier, G. & Bolarín, M.C., 1994. Na Cl stress-induced organic solute changes on leaves and calli of *Lycopersicon esculentum*, *L. pennellii* and their interspecific hybrid. J. Plant Physiol. 143:106-111.
- Phillips, R.D. & McWatters, K.M., 1991. Contribution of cowpeas to nutrition and health. Food Technol. 45:127-130.
- Prisco, J.T., 1980. Alguns aspectos da fisiologia do “stress” salino. Rev. Bras. Bot. 3:85-94.
- Puiatti, M. & Sodek, L., 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. Plant Physiol. Biochem. 37:767-773.
- Reggiani, R., Cantu, C.A., Brambilla, I. & Bertani, A., 1988. Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under anoxia. Plant Cell Physiol. 29:981-987.
- Rubinigg, M., Posthumus, F., Ferschke, M., Theo, J., Elzenga, M. & Stulen, I., 2003. Effects of NaCl salinity on ¹⁵N-nitrate fluxes and specific root length in the halophyte *Plantago maritima* L.. Plant Soil 250:201-213.
- Rudolph, A.S., Crowe, J.H. & Crowe, L.M., 1986. Effects of three stabilizing agents – proline, betaine, and trehalose – on membrane phospholipids. Arch. Biochem. Biophys. 245:134-143.

- Saab, I.M., Sharp, R.E., Pritchard, J. & Voetberg, 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.
- Silveira, J.A.G., Melo, A.R.B., Viégas, R.A. & Oliveira, J.T.A., 2001. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Env. Exp. Bot.* 46:171-179.
- Silveira, J.A.G., Viégas, R.A., Rocha, I.M.A., Moreira, A.C.O.M., Moreira, R.A. & 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.
- Sousa, C.A.F. & Sodek, L., 2003. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Env. Exp. Bot.* 50:1-8.
- Subbarao, G.V., Ito, O, Berry, W.L. & Wheeler, R.M., 2003. Sodium – a functional plant nutrient. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22:391-416.
- Szabolcs, I., 1994. Salt affected solis as the ecosystem for halophytes. IN: Halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands. (Squires, V.R. & Ayaoub, A.T., eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp.19-24.
- Tabatabaei, S.J., 2006. Effects of salinity and N on the growth, photosynthesis and N status of olive (*Olea europaea* L.) trees. *Sci. Hort.* 25:432-438.
- Tester, M. & Davenport, R., 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91:503-527.

- Thomas, A.L., 2004. Modificações morfológicas e assimilação de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max*) com sistemas radiculares sob deficiência de O₂. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Umezawa, T., Mizuno, K. & Fujimura, T., 2002. Discrimination of genes expressed in response to the ionic or osmotic effect of salt stress in soybean with cDNA-AFL. *Plant Cell Env.* 25:1617-1625.
- Volkmar, K.M., Hu, Y. & Steppurhn, H., 1998. Physiological responses of plants to salinity: A review. *Can. J. Plant Sci.* 78:19-27.
- Wang, D. & Shannon, M.C., 1999. Emergence and seedling growth of soybean cultivars and maturity groups under salinity. *Plant Soil* 214:117-124.
- Wang, D., Shannon, M.C. & Grieve, C.M., 2001. Salinity reduces radiation absorption and use efficiency in soybean. *Field Crops Res.* 69:267-277.
- Woodward, A.J. & Bennett, I.J., 2005. The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of *in vitro* propagated shoots of *Eucalyptus camadulensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 82:189-200.
- Yeo, A., 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49:915-929.
- 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.