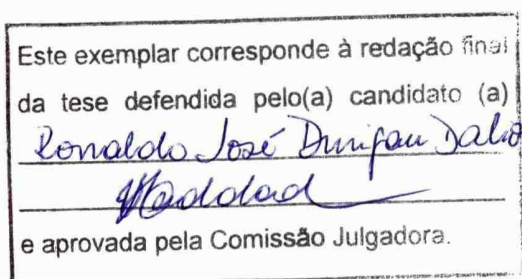


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**RONALDO JOSÉ DURIGAN DALIO**



**EFEITO DE BRASSINOSTERÓIDE NO  
CRESCIMENTO, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EM PLANTAS  
DE *Cajanus cajan* (L.) MILLSP, SUBMETIDAS A  
ESTRESSE SALINO**



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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia R. B. Haddad**

**2007**

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

**D159e**

Dalio, Ronaldo José Durigan

Efeito de brassinosteróide no crescimento, parâmetros bioquímicos e transporte de aminoácidos em plantas de *Cajanus cajan* (L.) Millsp, submetidas a estresse salino / Ronaldo José Durigan Dalio. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Claudia Regina Baptista Haddad.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Brassinosteróides. 2. Clotrimazol. 3. Salinidade.  
4. Guandu. I. Haddad, Claudia Regina Baptista. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

(rcdt/lb)

**Título em inglês:** Effect of brassinosteroid on growth, biochemical composition and transport of amino acids in plants of *Cajanus cajan* (L.) Millsp, cultivated under salt stress.

**Palavras-chave em inglês:** Brassinosteroids; Clotrimazol; Salinity; Pigeon pea.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Claudia Regina Baptista Haddad, Ladaslav Sodek, José Tarquínio Prisco.

**Data da defesa:** 07/12/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal.

Campinas, 07 de dezembro de 2007.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Baptista Haddad (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

  
Assinatura

Prof. Dr. José Tarquínio Prisco

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Vítor José Mendes Cardoso

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**Dedico esta tese à minha família que esteve ao meu lado em todos os momentos, dando suporte e força, sem nunca duvidar de minha capacidade.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de realização do curso de mestrado em Biologia Vegetal.

À Universidade Estadual de Londrina, responsável por minha formação como Biólogo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Extensão da Unicamp pelo auxílio financeiro.

À professora Claudia R. B. Haddad pela orientação, dedicação, paciência, carinho e amizade.

Ao professor Ladaslav Sodek pelos esclarecimentos, sugestões e orientação durante todo o curso e durante a pré-banca.

Aos professores Jorge Veja e Marcelo Dornelas pelas valiosas críticas e sugestões na pré-banca.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp que colaboraram para a realização deste trabalho, em especial para Dulcinéia Pereira de Souza.

A todos os amigos que apoiaram e incentivaram a realização deste trabalho, em especial para Hellen, Gilberto e Tiago.

À minha família pelo suporte e incentivo.

À Jaqueline pelo carinho, cuidado e por me fortalecer nos momentos mais difíceis.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                           |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE.....                                                                                                                               | vi   |
| RESUMO.....                                                                                                                               | viii |
| SUMMARY.....                                                                                                                              | ix   |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                        | 1    |
| 2.OBJETIVOS.....                                                                                                                          | 9    |
| 2.1 Objetivo Geral.....                                                                                                                   | 9    |
| 2.2 Objetivos Específicos.....                                                                                                            | 9    |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                | 10   |
| 3.1 Material vegetal e condições de cultivo.....                                                                                          | 10   |
| 3.1.1 Exposição das plantas de <i>Cajanus cajan</i> ao estresse salino.....                                                               | 10   |
| 3.1.2 Aplicações de brassinosteróide e clotrimazol.....                                                                                   | 11   |
| 3.2 Avaliações dos parâmetros de crescimento.....                                                                                         | 11   |
| 3.2.1 Altura da parte aérea e comprimento das raízes.....                                                                                 | 11   |
| 3.2.2 Área foliar.....                                                                                                                    | 11   |
| 3.2.3 Massa fresca.....                                                                                                                   | 11   |
| 3.2.4 Massa seca.....                                                                                                                     | 12   |
| 3.2.5 Massa seca livre de cinzas.....                                                                                                     | 12   |
| 3.2.6 Número de folhas.....                                                                                                               | 12   |
| 3.2.7 Suculência.....                                                                                                                     | 12   |
| 3.3 Avaliações dos parâmetros bioquímicos.....                                                                                            | 12   |
| 3.3.1 Extração e dosagem de pigmentos fotossintéticos nas folhas.....                                                                     | 12   |
| 3.3.2 Extração de metabólitos das raízes.....                                                                                             | 13   |
| 3.3.3 Dosagem de proteínas nas raízes.....                                                                                                | 13   |
| 3.3.4 Dosagem de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) nas raízes.....                                                                              | 14   |
| 3.3.5 Dosagem de açúcares solúveis totais e sacarose nas raízes.....                                                                      | 14   |
| 3.3.6 Dosagem de aminoácidos livres nas raízes.....                                                                                       | 14   |
| 3.3.7 Dosagem de prolina.....                                                                                                             | 15   |
| 3.3.8 Coleta da seiva do xilema.....                                                                                                      | 15   |
| 3.3.9 Separação e análise da composição de aminoácidos livres na seiva do xilema por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)..... | 15   |
| 3.3.10 Dosagem dos aminoácidos livres totais na seiva do xilema.....                                                                      | 17   |
| 3.4 Delineamento experimental e análise estatística.....                                                                                  | 19   |
| 4. RESULTADOS.....                                                                                                                        | 20   |
| 4.1 Interação entre hormônio e salinidade.....                                                                                            | 20   |
| 4.1.1 Interação entre hormônio e salinidade nos parâmetros de crescimento.....                                                            | 20   |
| 4.1.2 Interação entre hormônio e salinidade nos parâmetros bioquímicos.....                                                               | 21   |
| 4.2 Efeito da salinidade em parâmetros de crescimento de plantas de <i>C. cajan</i> .....                                                 | 22   |
| 4.3 Efeito de brassinosteróide em parâmetros de crescimento de plantas de <i>C. cajan</i> , submetidas ao estresse salino.....            | 25   |
| 4.3.1 Parâmetros onde foram encontradas interações significativas entre hormônio e sal.....                                               | 25   |
| 4.3.2 Parâmetros de crescimento onde não foram encontradas interações significativas entre hormônio e sal.....                            | 27   |
| 4.4 Efeito da salinidade em parâmetros bioquímicos de plantas de <i>C. cajan</i> .....                                                    | 28   |
| 4.5 Efeito de brassinosteróide em parâmetros bioquímicos de plantas de <i>C. cajan</i> , submetidas ao estresse salino.....               | 31   |

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6 Efeito de brassinosteróide no transporte de aminoácidos em seiva de xilema de plantas de <i>C. cajan</i> , submetidas ao estresse salino..... | 34 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                                                                                                | 39 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                                                                                               | 50 |
| 7.BIBLIOGRAFIA CITADA .....                                                                                                                       | 51 |

## RESUMO

Plantas de *Cajanus cajan* receberam aplicações de brassinosteróide ou de clotrimazol (inibidor de síntese de brassinosteróides) e foram submetidas à salinidade. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de duas concentrações de brassinosteróide ( $1 \times 10^{-7}$  e  $0,5 \times 10^{-9}$  M) e uma de clotrimazol ( $1 \times 10^{-4}$  M), no crescimento, composição bioquímica e transporte de aminoácidos em plantas de *C. cajan*, submetidas à duas concentrações de NaCl (200 e 400 mM). A salinidade afetou os parâmetros de crescimento (massas frescas e secas, comprimento da parte aérea e da maior raiz, número de folhas, área e suculência foliar), os parâmetros bioquímicos (teores de nitrato, prolina, aminoácidos livres, proteínas totais, açúcares solúveis, sacarose, clorofilas e carotenóides) e o padrão dos aminoácidos transportados. A proporção da maioria dos aminoácidos transportados no xilema diminuiu sob salinidade, com exceção de alanina e serina. A concentração de NaCl a 400 mM provocou as maiores alterações. A aplicação de clotrimazol mostrou-se eficiente na inibição dos efeitos provocados por brassinosteróide na grande maioria dos parâmetros estudados, sob salinidade. Não houve diferença em relação à eficiência das duas concentrações de brassinosteróide utilizadas na maioria dos parâmetros avaliados. A aplicação de brassinosteróide amenizou o efeito do estresse salino na maioria dos parâmetros de crescimento, dos parâmetros bioquímicos e no padrão de aminoácidos transportados em plantas de *C. cajan*, submetidas à salinidade.

## SUMMARY

Plants of *Cajanus cajan* received applications of brassinosteroid or clotrimazol (brassinosteroids synthesis inhibitor), and were subjected to salt stress. The goal of this study was to verify the effect of two concentrations of brassinosteroid ( $1.0 \times 10^{-7}$  and  $0.5 \times 10^{-9}$  M), and one concentration of clotrimazol ( $1.0 \times 10^{-4}$  M) on growth, biochemical composition and transport of amino acids in plants of *C. Cajan*, cultivated under two concentrations of NaCl (200 and 400 mM). The salt affected growth (fresh and dry mass, shoot length and main root length, number of leaves, leaf area and succulence of leaves) and biochemical parameters (nitrate, proline, free aminoacids, total protein, soluble sugars, sucrose, chlorophylls and carotenoids concentrations), and changed the pattern of amino acids transported. The proportion of most of the amino acids transported in the xylem was reduced by salinity. Alanine and serine were exceptions. The largest alterations were caused by 400 mM of NaCl. Clotrimazol was effective in inhibiting the effects caused by brassinosteroid for the great majority of studied parameters. There was no difference between the two concentrations of brassinosteroid for most parameters evaluated, under salinity. The application of brassinosteroid was effective diminishing the effect of salt on most of the growth and biochemical parameters, and in the patterns of amino acids transported in plants of *C. Cajan* subjected to salt stress.

## 1. INTRODUÇÃO

Estresse é usualmente definido como qualquer condição provocada por um fator externo que cause desvantagem para a planta, alterando seu crescimento e desenvolvimento normal (Taiz & Zeiger, 2004). Os agentes indutores de estresse ou estressores podem ser de origem biótica, como na herbivoria e doenças causadas por bactérias, fungos e vírus, ou de origem abiótica, como nos estresses provocados por fatores físicos, como seca, radiação, temperaturas extremas, alagamento e vento ou causados por fatores químicos, como poluição do ar, metais pesados, pesticidas, toxinas, pH do solo e salinidade (Nielsen & Orcutt, 1996).

O excesso de sais solúveis no solo pode reduzir a produtividade de diversas plantas (Allison *et al.*, 1985). A sensibilidade da planta ao sal varia entre as espécies, cultivares da mesma espécie e depende de alguns fatores como o tipo e a concentração de sal, o tempo e o número de exposições ao sal, o estágio de desenvolvimento da planta, a umidade do ar e do solo e a intensidade de luz (Flowers *et al.*, 1977; Costa *et al.*, 2003; Ashraf & Harris, 2004).

Em condições naturais, solos salinizados podem ser encontrados em regiões costeiras (Haddad & Mazzafera, 1999), em regiões com história geológica marinha recente (Tester & Davenport, 2003) e em regiões com intenso intemperismo químico (Oliveira, 2001). Por outro lado, práticas inadequadas de irrigação e drenagem em áreas onde a água é salobra, geralmente em regiões áridas e semi-áridas, também podem levar ao acúmulo de sais no solo (Flowers & Yeo, 1995; Tester & Davenport, 2003).

A salinidade afeta civilizações desde a antiguidade até os tempos atuais. Existem relatos de que a salinidade dos solos afligiu antigas civilizações no sul da mesopotâmia e no vale dos rios Tigre e Eufrates, que haviam prosperado por séculos naquela região (Jacobsen & Adams, 1958).

Atualmente, solos salinizados são naturalmente encontrados em mais de 100 países (Rengasamy, 2006). A área global afetada por solos salinizados é de 831 milhões de hectares, distribuídos em todos os continentes (FAO, 2000), sendo que o total de solos salinizados no continente sul-americano representa 14% desse total (Rengasamy, 2006).

No Brasil, os solos salinos são encontrados, principalmente, nas regiões semi-áridas nordestinas, pantanal mato-grossense e áreas litorâneas relacionadas com a vegetação de mangue (Oliveira, 2001).

As plantas podem ser separadas em halófitas e glicófitas de acordo com sua sensibilidade ao sal. As halófitas conseguem completar seu ciclo de vida em ambientes salinos, com 0,5% ou mais de sal, (Wainright, 1984; O'Leary & Glenn, 1994), enquanto que as glicófitas não o fazem nessas condições (Wainright, 1984). A maior parte das plantas cultivadas é classificada como glicófita. Processos metabólicos essenciais, como respiração e fotossíntese, são sensíveis ao sal tanto em halófitas como em glicófitas (Volkmar *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 íons (Lewis *et al.*, 1989; Volkmar *et al.*, 1997; Umezawa *et al.*, 2002; Carillo *et al.*, 2005). A redução do potencial hídrico do solo, causada pelos sais, pode levar ao déficit hídrico e causar a morte da planta. Com a redução do potencial hídrico do solo as plantas podem reduzir também o potencial osmótico de suas células para manter a entrada de água nas raízes. Este processo é conhecido como “ajustamento osmótico” e ocorre tanto em glicófitas, como em halófitas (Prisco, 1980; Demiral & Türkan, 2005).

Durante o processo de ajustamento osmótico, solutos orgânicos compatíveis são acumulados nas raízes (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 *et al.*, 2000), o que contribui para a manutenção da turgescência celular e estabilização da conformação ativa de enzimas citoplasmáticas, protegendo-as contra a inativação por íons (Volkmar *et al.*, 1997; Carillo *et al.*, 2005). Dentre os solutos compatíveis estão: aminoácidos (PRO), compostos de amônio quartenário (glicina betaína, prolina betaína e O-sulfato de colina), compostos de sulfônio terciário (propionato de dimetilsulfônio), álcoois poli-hídricos (pinitol, manitol e sorbitol) e ainda açúcares solúveis (Volkmar *et al.*, 1997; Buchanan *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2003; Ashraf & Harris, 2004). Em geral, as plantas tolerantes à salinidade têm mais açúcares solúveis que as sensíveis (Ashraf & Harris, 2004). Os açúcares solúveis contribuem no mínimo com 50 % do potencial osmótico total em glicófitas crescendo em ambientes salinos (Ashraf, 1994). Em plantas de trigo (Kafi *et al.*, 2003), arroz, soja e algodão (Rathert, 1982, *in* Kafi *et al.*, 2003) e *Plantago coronopus* foi verificado que a sacarose pode ser utilizada para o ajustamento osmótico (Koyro, 2006).

Entre os efeitos tóxicos específicos dos sais estão: alteração na absorção e transporte de elementos essenciais e nitrato (Santa-Maria *et al.*; 1997; Cerezo *et al.*, 1997), alterações no metabolismo de proteínas, aparecimento de necrose foliar, redução na taxa de fotossíntese e na produtividade (Lewis *et al.*, 1989; Tester & Davenport, 2003).

Os processos de crescimento são especialmente sensíveis aos efeitos do sal, de modo que a produção de biomassa e a taxa de crescimento são bons critérios para se determinar o grau de estresse e da capacidade da planta em superar a salinidade (Larcher, 2000). A salinidade reduz o crescimento mesmo em espécies consideradas tolerantes ao sal, embora as plantas tolerantes sejam capazes de manter maiores taxas de crescimento em relação às sensíveis, quando submetidas às mesmas concentrações de sal (Neumann, 1997). Sob salinidade houve redução nas massas frescas de plantas de milho (Lohaus *et al.*, 2000) e arroz

(Núñez *et al.*, 2003/4). Munns e Termaat (1986) determinaram o crescimento de plantas de trigo, cevada, tremoço e algodão sob estresse salino e sugeriram que a inibição do crescimento está relacionada à redução na taxa de expansão foliar. A menor área foliar pode ser a principal causa do crescimento reduzido da planta, pois acarreta redução na fotossíntese (Marcelis & Hooijdonk, 1999; McCree, 1986; Zhu, 2001; Netondo *et al.*, 2004).

Por outro lado, a menor taxa de crescimento foliar pode representar uma adaptação ou aclimatação ao estresse salino. A inibição de crescimento foliar pode prolongar a vida da planta, pois diminui a transpiração e otimiza o consumo da água, que se encontra indisponível (Richards, 1993, in Neumann, 1997).

Outra adaptação à salinidade é o aumento da suculência, devido ao acúmulo de água nas células da folha, diminuindo, dessa forma, o déficit hídrico (Costa *et al.* 2003) e reduzindo a concentração de sais no protoplasma (Larcher, 2000).

Cultivo sob salinidade levou à redução no número de folhas em *Dalbergia sissoo* (Rawat & Banerjee, 1998), *Vigna vexillata* (Okusanya & Oyesiku, 1994), *Beta vulgaris* (Ghoulam *et al.*, 2002) e *Cakile maritima* (Debez *et al.*, 2004). Segundo Netondo *et al.* (2004), sob salinidade a redução na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  nas folhas mais velhas afeta o desenvolvimento de novas folhas.

A salinidade pode alterar o metabolismo dos cloroplastos, afetando a fotossíntese (Sultana *et al.*, 1999). A aplicação de cloreto de sódio levou à redução de clorofilas em plantas de *Vigna radiata* (Amzallag & Goloubinoff, 2006), arroz (Singh & Dubey, 1995), *Argyranthemum coronopifolium* (Herralde *et al.*, 1998), *Hydrocotyle bonariensis* e *Foeniculum vulgare* (Haddad & Mazzafera, 1999).

A principal fonte de nitrogênio para as plantas cultivadas é o nitrato (Silveira *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002). A absorção de nitrato é reduzida sob salinidade (Rubinigg *et al.*,

2003) e esta redução afeta a assimilação de nitrogênio (Silveira *et al.*, 2001) necessário à síntese protéica.

Sob salinidade a concentração de proteínas diminui na maioria das espécies vegetais (Misra *et al.*, 1997; Evers *et al.*, 1997), devido a uma redução na síntese protéica e aumento na proteólise (Silveira *et al.*, 2003). A síntese protéica diminui porque ocorre aumento de Na<sup>+</sup> no interior da célula (Costa *et al.*, 2003), e este compete com o K<sup>+</sup> (Subbarao *et al.*, 2003; Tester & Davenport, 2003) que é necessário para unir o RNA transportador aos ribossomos. O aumento da proteólise leva a acréscimo na concentração de aminoácidos livres totais (Silveira *et al.*, 2003; Ashraf & Harris, 2004).

Apesar das profundas alterações ocorridas no metabolismo do nitrogênio sob condições de estresse, pouca atenção tem sido dada ao transporte de nitrogênio nestas condições. O interesse no transporte de nitrogênio no xilema está centrado, principalmente, no entendimento de relações e processos metabólicos que ocorrem em outras partes da planta, particularmente, nas raízes (Puiatti & Sodek, 1999).

O tipo e a proporção dos aminoácidos transportados na seiva do xilema podem ser alterados, dependendo das condições de cultivo da planta. Assim, o aumento no teor de ALA é visto como indicador de anaerobiose (Puiatti & Sodek, 1999; Reggiani *et al.*, 2000; Sousa & Sodek, 2002; Thomas *et al.*, 2005), enquanto que a porcentagem de ASP diminui sob inundação (Amarante *et al.*, 2006; Lima & Sodek, 2003). A presença de sal no meio também afeta a absorção e transporte de compostos nitrogenados das raízes para a parte aérea da planta. Nestas condições houve decréscimo na absorção e assimilação de nitrogênio em plantas de feijão-de-corda (Silveira *et al.*, 1999) e alteração na composição de aminoácidos no xilema, em plantas de soja (Serraj *et al.*, 1998, 1999) e *Mesembryanthemum crystallinum* (Popova *et al.*, 2003).

A partir da análise da composição de aminoácidos da seiva do xilema das raízes de *Leptochloa fusca* e *Atriplex hortensis* crescendo na presença de sal, é possível dizer que os principais aminoácidos transportados eram GLN e ASN (Jeschke *et al.*, 1995). Em folhas de *Anacardium occidentale* crescendo sob estresse salino, houve aumento da concentração de GLU, em relação às plantas controle. Contudo nas folhas das plantas cultivadas em presença de sal, a proporção desse aminoácido diminuiu em relação aos demais (Silveira *et al.*, 2003). Estes mesmos aminoácidos aumentaram nas raízes e seiva do xilema de plantas de cevada crescendo sob salinidade (Ashraf & Harris, 2004). Aumentos de GABA em folhas, calos e raízes foram verificados por Bolarín *et al.* (1995), em tomateiros submetidos ao estresse salino.

Aumentos nas concentrações de PRO foram associados à maior tolerância ao estresse salino em *Phaseolus aureus* (Misra & Gupta, 2005), em plantas de amendoim (Jain *et al.*, 2001), de arroz (Basu *et al.*, 2002), de trigo (Kafi *et al.*, 2003) e de eucalipto (Woodward & Bennett, 2005). Contudo, a concentração desse aminoácido não aumentou em *Arabidopsis thaliana* (Liu & Zhu, 1997), em plantas de beterraba (Ghoulam *et al.*, 2002) e de arroz (Demiral & Türkan, 2005) cultivadas com NaCl.

Em 1979, foram descobertos esteróides com funções hormonais em pólen de *Brassica napus*. Atualmente mais de quarenta tipos de esteróides foram isolados de vegetais e denominados Brassinosteróides (Khripach *et al.*, 1999). Os brassinosteróides regulam vários tipos de atividades no crescimento e desenvolvimento de plantas, como a promoção de expansão e divisão celular, crescimento de tubo polínico, germinação, diferenciação do xilema, mudanças no potencial de membrana, inibição do crescimento de raiz e abscisão. Contudo, a principal ação destes hormônios encontra-se na promoção de tolerância a diversos tipos de estresses (Zullo & Adam, 2002), inclusive o estresse salino (Clouse & Sasse, 1998; Khripach *et al.*, 1999). Aplicações de brassinosteróides diminuíram o efeito inibitório do NaCl

no crescimento de *Pisum sativum* (Amzallag & Vaismam, 2006) e de plantas de amendoim (Vardhini & Rao, 1997) e arroz (Anuradha & Rao, 2001; Ozdemir *et al.*, 2004).

Durante a síntese de brassinosteróides, posteriormente à síntese de esteróis, é formado o campesterol. Após algumas transformações, este composto dá origem à castasterona, que por sua vez, origina os brassinolídeos. Durante a síntese dos brassinolídeos, deve haver hidroxilações no carbono 25 dos compostos intermediários. Estas hidroxilações são realizadas por enzimas dependentes do citocromo P450 (Khripach *et al.* 1999).

O clotrimazol, substância da classe dos imidazoles, empregado como medicamento no combate a doenças causadas por fungos, tem sido usado como inibidor da síntese de brassinosteróides. A ação deste composto deve-se a sua capacidade de interferir em desmetilações do grupamento M do citocromo P450, inibindo assim enzimas dependentes deste citocromo e dessa forma bloqueando a síntese de esteróides (Bach, 1985).

Recentemente foi verificado que adição de clotrimazol impediu a resposta gravitrópica em raízes de *Pisum sativum*. A resposta gravitrópica foi parcialmente restaurada com a adição de 24-epi-brassinolídeo, sugerindo que o Clotrimazol afeta a síntese de brassinosteróides (Amzallag & Vaismam, 2006).

*Cajanus cajan* é uma leguminosa da sub-família Papilionoideae, conhecida popularmente como guandu, guando, anduzeiro, guandeiro, ervilha-de-angola, ervilha-de-árvore, ervilha-de-sete-anos, ervilha-do-congo, feijão-de-árvore, feijão-do-congo, feijão-guando e tantaraga (Houaiss & Villar, 2004). É um dos legumes mais amplamente cultivados em países tropicais e sub-tropicais (Summerfield & Roberts, 1985 in Akintayo *et al.* 1999), estando entre as quinze culturas mais importantes do mundo (Salunkhe *et al.*, 1986). Trata-se de espécie tolerante à seca e a solos pouco férteis (Wutke, 1987 in Giomo *et al.*, 2001), adaptada a um amplo gradiente de umidade e que se desenvolve melhor sob temperaturas mais elevadas (Mitidieri, 1983 in Amabile *et al.*, 2000). A maioria dos acessos floresce sob dias

curtos (Summerfield & Roberts, 1985 *in* Amabile *et al.*, 2000). Suas sementes, ricas em proteína, podem ser consumidas *in natura*, ou como suplemento em farinhas destinadas ao preparo de massas (Casagrandi *et al.*, 1999; Corzo & Fuentes, 2004). Suas plantas também têm sido usadas como adubo verde, com a finalidade de enriquecer o solo e melhorar a produtividade de outras culturas (Carvalho *et al.*, 2004; Heinrichs *et al.* 2005).

Em trabalhos avaliando o efeito do estresse salino no crescimento de *Cajanus cajan* foi verificado que a presença de NaCl levou a reduções em diversos parâmetros, como: crescimento da planta (Joshi & Nimbalkar, 1983; Subbarao *et al.*, 1991; Ashraf, 1994), área foliar, índice de área foliar, taxa de crescimento da cultura, taxa de crescimento relativo, taxa de assimilação líquida, além de redução na produtividade (Joshi & Nimbalkar, 1983).

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de brassinosteróide em plantas de *Cajanus cajan* submetidas a duas concentrações de NaCl.

### 2.2 Objetivos Específicos

Verificar o efeito da salinidade em parâmetros de crescimento, bioquímicos e no transporte de aminoácidos na seiva do xilema de plantas de *Cajanus cajan*.

Verificar se o brassinosteróide atenua as alterações ocasionadas em parâmetros de crescimento, bioquímicos e no transporte de aminoácidos, em função da exposição de plantas de *Cajanus cajan* ao estresse salino.

Verificar os efeitos da aplicação de clotrimazol, inibidor de síntese de brassinosteróides.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal e condições de cultivo

Plantas de *Cajanus cajan* (L.) Millsp, cultivar C11, fornecidas pelo Instituto Agrônômico de Campinas, foram cultivadas em casa de vegetação, sob luz natural, em dois períodos: novembro e dezembro de 2006 e fevereiro e março de 2007, resultando em dois experimentos semelhantes, sendo que o primeiro foi utilizado para análises de crescimento e o segundo para análises bioquímicas. Nos dois períodos a temperatura variou de 19 a 40°C.

As sementes foram mantidas em água destilada por 48 horas, sem aeração e depois semeadas em copos plásticos de 700 mL contendo perlita. Foram irrigadas diariamente com água de torneira até a queda dos cotilédones. A partir desta fase cada planta recebeu 150 mL de solução nutritiva normal de Hoagland & Arnon (1939), acrescida ou não de NaCl.

##### 3.1.1 Exposição das plantas de *Cajanus cajan* ao estresse salino

A fim de permitir a adaptação gradual das plantas ao sal, evitando choque osmótico, as concentrações de NaCl foram aumentadas gradativamente, a cada dois dias, em 50 mM, até que fossem atingidas as concentrações finais de 200 e 400 mM. Ao todo, as plantas foram expostas ao sal por 16 dias.

Nas aplicações de solução nutritiva, a exposição uniforme das raízes ao sal foi assegurada pelo encaixe dos copos de 700 mL, furados, dentro de copos sem furos, com menor altura e diâmetro maior. Dessa forma, a solução, presente no vasos externos, subiu por capilaridade, preenchendo os copos com plantas até a superfície da perlita, enquanto que no copo externo restou, aproximadamente, 1 cm de solução nutritiva. Os vasos foram mantidos úmidos, mas não alagados. Não foi observada nenhuma alteração morfológica externa, nem

variação no diâmetro dos caules, que caracterizassem formação de aerênquima, indicando hipoxia para as plantas. Entre uma aplicação e outra, os copos externos foram retirados e as plantas lavadas com 150mL de solução nutritiva, para evitar acúmulo de sal e deixadas por 24 horas escorrendo, para evitar diluição posterior da solução nutritiva.

### **3.1.2 Aplicações de brassinosteróide e clotrimazol**

O brassinosteróide (24-epibrassinolídeo) da marca Sigma E 1641 foi dissolvido em etanol (1mg/mL), diluído em solução nutritiva até as concentrações de  $10^{-7}$  M (BR7) e  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9) e aplicado no substrato uma semana antes da aplicação do sal.

O inibidor de síntese de esteróides clotrimazol, da marca Sigma, foi dissolvido em DMSO (dimetilsulfoxido), diluído em solução nutritiva até a concentração de  $10^{-4}$  M e aplicado no substrato uma semana antes da aplicação do sal.

## **3.2 Avaliações 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.

### **3.2.2 Área foliar**

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

### **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 por 72 horas em estufa com ventilação forçada a 80°C.

#### **3.2.5 Massa seca livre de cinzas**

As massas secas livres de cinzas foram calculadas com o objetivo de se avaliar 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 determinada anteriormente.

#### **3.2.6 Número de folhas**

Todas as folhas com comprimento do limbo maior que 1 cm foram contadas.

#### **3.2.7 Suculência**

Foi calculada a razão massa de água/ área foliar (suculência foliar). A massa de água foi calculada pela diferença entre massa fresca e massa seca.

### **3.3 Avaliações dos parâmetros bioquímicos**

#### **3.3.1 Extração e dosagem de pigmentos fotossintéticos nas folhas.**

A determinação dos pigmentos fotossintéticos foi feita segundo Hiscox & Israeltam (1979). Foram utilizados 10 mg de massa fresca de folhas. Este material vegetal foi imerso em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), em tubos de ensaio revestidos por papel alumínio e vedados. Outra parte foi deixada em estufas a 80°C para medir a massa seca. Após 48 horas, foram determinadas as absorbâncias a 663, 645 e 470. Os teores de clorofilas *a*, *b*, total e

carotenóides foram calculados de acordo com a equação de Arnon (1949) e Lichtenthaler & Welburn (1983).

### **3.3.2 Extração de metabólitos das raízes**

As raízes foram lavadas com água de torneira e secas em papel absorvente. Foram congeladas, liofilizadas e maceradas em almofariz. O material foi pesado, colocado em tubos e a extração realizada com metanol: clorofórmio: água (MCW), na proporção de 12:5:3 (Bielecki & Turner, 1966). O material permaneceu 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 (SP, Brasil). O sobrenadante foi recuperado 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, a fase clorofórmica foi descartada e a fase aquosa foi aquecida em banho-maria a 38°C, por 8 horas, para eliminar o resíduo de clorofórmio e concentrar a amostra. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14.000 *g* por 5 minutos, em centrífuga BECKMANN, modelo Avanti™ J-30I (EUA) e o sobrenadante foi recuperado. As amostras foram armazenadas a -20°C e usadas para avaliações dos teores de nitrato, aminoácidos livres totais, açúcares solúveis totais, sacarose e PRO. O precipitado (MCW) foi recuperado para dosagem posterior de proteínas nas raízes.

### **3.3.3 Dosagem de proteínas nas raízes**

O precipitado obtido em 3.3.2 foi ressuspenso em 10 ml de NaOH a 0.1 N. Foi homogeneizado com bastão de vidro e após 24 h centrifugou-se o extrato a 2000 *g* por 30 minutos e coletou-se o sobrenadante, contendo a fração protéica. O método utilizado para a dosagem foi o descrito por Bradford (1976), utilizando-se BSA como padrão. A leitura das

absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS da marca FEMTO, modelo 600, a 595 nm.

#### **3.3.4 Dosagem de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) nas raízes**

A determinação de  $\text{NO}_3^-$  foi baseada no método de Cataldo *et al.* (1975). A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS da marca FEMTO, modelo 600, a 410 nm.  $\text{KNO}_3^-$  foi utilizado como padrão.

#### **3.3.5 Dosagem de açúcares solúveis totais e sacarose nas raízes**

O método utilizado foi o de fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de amostra, ou de água desionizada (branco), ou de soluções de sacarose (padrões). Foram acrescentados 450  $\mu\text{L}$  de água desionizada, 500  $\mu\text{L}$  de reagente fenólico a 5% e 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Agitou-se cuidadosamente. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro UV/VIS da marca FEMTO, modelo 600, a 490 nm, após as soluções terem atingido a temperatura ambiente.

A dosagem de sacarose foi feita de acordo com Handel (1968)

#### **3.3.6 Dosagem de aminoácidos livres nas raízes**

Os aminoácidos foram determinados de acordo com Moore & Stein (1948). Foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de amostra, ou de água desionizada (branco), ou dos padrões (soluções de LEU). Foram acrescentados 950  $\mu\text{L}$  de água desionizada, 500  $\mu\text{L}$  de tampão citrato a 0,2 M e pH 5,0, 200  $\mu\text{L}$  de ninhidrina a 5 % e 1000  $\mu\text{L}$  de KCN 0,01 M a 2 %, diluídos em éter monometílico de etilenoglicol. Os tubos foram tampados com bolinhas de vidro, agitados e incubados em banho-maria a 100°C por 20 minutos. A seguir, os tubos foram mantidos no escuro, até que atingissem a temperatura ambiente. O volume foi completado para 4 mL com

etanol a 60%. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro UV/VIS, da marca FEMTO, modelo 600, a 570 nm e leucina foi utilizada como padrão.

### **3.3.7 Dosagem de prolina**

Para a dosagem de prolina, foi utilizada a fração aquosa do MCW. As dosagens foram realizadas de acordo com o método da ninhidrina ácida, descrito por Bates & Waldren (1973).

A ninhidrina ácida foi preparada utilizando-se os seguintes reagentes: 600 mg de ninhidrina, 15 mL de ácido acético glacial e 10 mL de ácido fosfórico. Foram utilizados 0,2 mL de amostra e em seguida foi adicionado 0,1 mL de glicina, sob agitação. O volume foi completado para 3 mL com água. Após adição de 2,0 mL de ácido acético e 2,0 mL de ninhidrina ácida sob intensa agitação, a mistura permaneceu por 35 minutos em banho-maria a 100 °C. Após rápido esfriamento em gelo, foram adicionados 4,0 mL de tolueno sob constante agitação. Duas frações foram separadas, sendo a fração rósea (toluênica) utilizada para leitura em espectrofotômetro a 515 nm.

### **3.3.8 Coleta da seiva do xilema**

Foi realizada conforme McClure & Israel (1979). O caule foi seccionado com lâmina de barbear abaixo do nó cotiledonar. O exsudato foi coletado com microcapilares e armazenado em tubos do tipo eppendorf, que foram mantidos em banho de gelo. As amostras foram congeladas para análises posteriores.

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

Foi realizada em coluna de fase reversa, após derivação com orto-ftaldialdeído (OPA), conforme Jarret *et al.* (1986).

Foi utilizado um cromatógrafo, da marca LKB, modelo 2150, com duas bombas controladas por um gerador de gradiente da marca LKB, modelo 2152 (Suécia).

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 + tetrahydrofurano a 20 mL/L + metanol a 20 mL/L.
- Solvente da bomba “B”: metanol 65 %.

Preparação do reagente OPA-borato: foram dissolvidos 50 mg de OPA em 1 mL de metanol, que 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  $\mu\text{m}$ ). Para a derivação, 5  $\mu\text{L}$  de mercaptoetanol foram adicionados a 625  $\mu\text{L}$  da mistura.

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

Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de amostra, ou padrão, foram misturadas com 60  $\mu\text{L}$  do reagente OPA-borato + mercaptoetanol em tubos do tipo eppendorf, que foram agitados manualmente. Após 2 min, foi concluída a derivação do reagente com os aminoácidos e uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  dessa mistura foi injetada no HPLC. Em seguida foi iniciada a corrida cromatográfica, com eluição da mistura em gradiente dos solventes das bombas “A” e “B” através da coluna cromatográfica (Waters Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 250 mm, da SUPELCO INC.). Foi fixado 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.

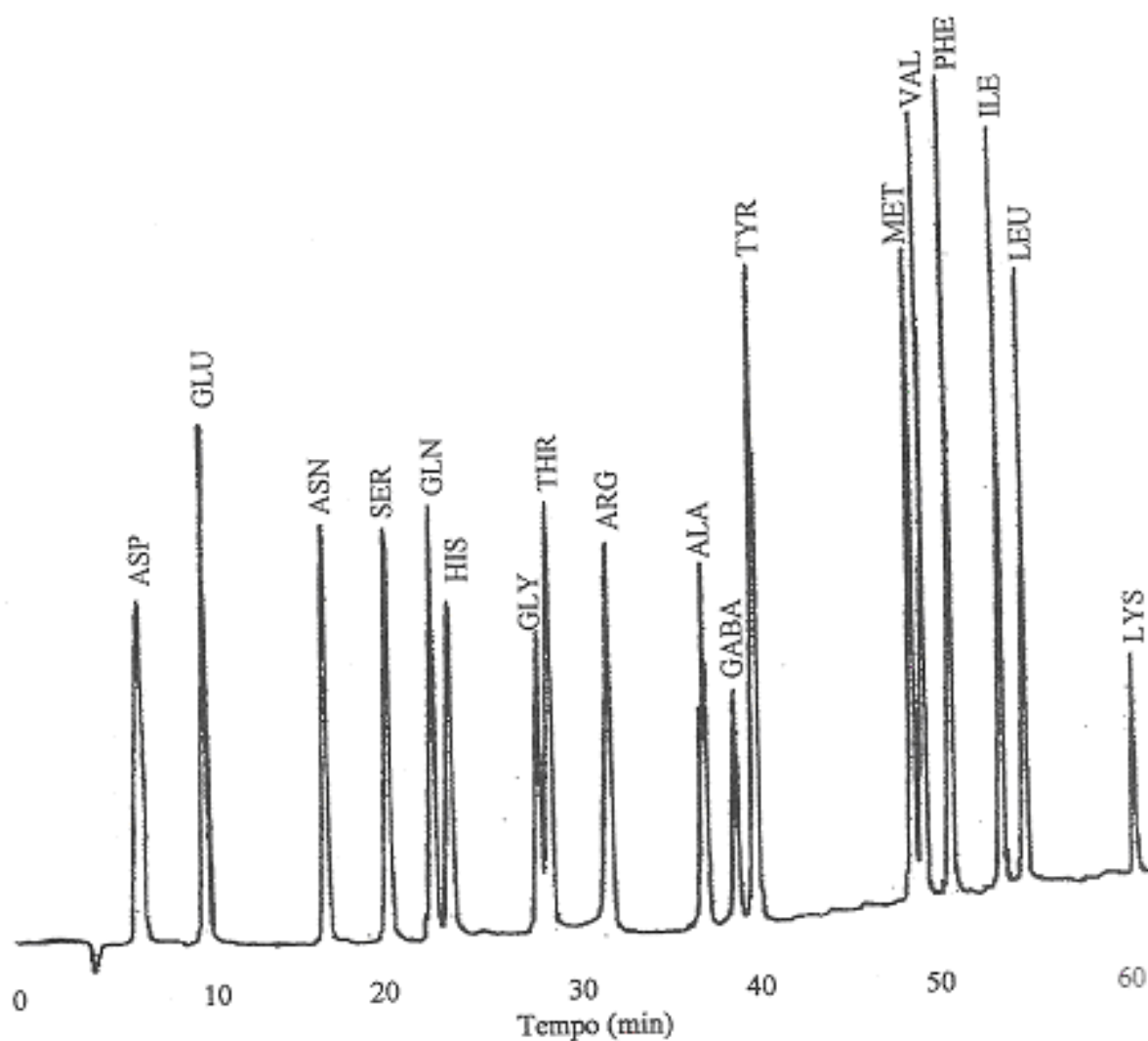
Os derivados aminoácidos-OPA foram detectados por monitor de fluorescência Shimadzu, modelo RF-530 (Japão), ajustado com comprimento de onda de 250 nm de

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 (Suécia).

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de um padrão Sigma AAS 18, diluído 20 vezes em água, 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).

#### **3.3.10 Dosagem 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 3.3.8.



**Figura 1.** Perfis de eluição de derivados OPA-aminoácidos do padrão Sigma ASS-18, enriquecido com ASN, GLN e GABA, utilizando-se coluna cromatográfica Spherisorb ODS-2 (5  $\mu$ m, 4,6 mm x 250 mm), em HPLC. Taxa de fluxo: 0,8 mL/min,  $\lambda$  de excitação: 250 nm,  $\lambda$  de emissão: 480 nm, solvente da bomba “A”:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 50 mM e pH 7,25, solvente da bomba “B”: metanol a 65 %. Ver texto para informação do gradiente.

### 3.4 Delineamento experimental e análise estatística

Foram utilizadas três concentrações de NaCl: 0 mM, 200 mM e 400 mM. Para cada concentração de sal foram cultivadas plantas com e sem aplicação prévia de brassinosteróide ou clotrimazol, totalizando 12 tratamentos (tabela 1).

**Tabela 1:** Desenho experimental. BR7: brassinosteróide na concentração de  $1 \times 10^{-7}$  M, BR9: brassinosteróide na concentração de  $0,5 \times 10^{-9}$  M, Clotri: clotrimazol  $1 \times 10^{-4}$  M.

| Conc. de sal | Tratamentos Hormonais |               |               |                  |
|--------------|-----------------------|---------------|---------------|------------------|
|              | 0                     | BR7           | BR9           | Clotri           |
| 0 mM         | 0                     | BR7           | BR9           | Clotri           |
| 200 mM       | Sal 200               | BR7 + Sal 200 | BR9 + Sal 200 | Clotri + Sal 200 |
| 400 mM       | Sal 400               | BR7 + Sal 400 | BR9 + Sal 400 | Clotri + Sal 400 |

O delineamento experimental foi um fatorial com três níveis de salinidade e quatro níveis de reguladores do crescimento (fatorial  $3 \times 4$ ), ou seja, contendo 12 tratamentos, cada um com 15 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância para dois fatores (Two Way, ANOVA). Nos casos onde houve interação significativa dos dois fatores (hormônio e sal) os dados foram submetidos à análise de variância simples (One Way) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

## 4. RESULTADOS

### **4.1 Interação entre hormônio e salinidade.**

As tabelas 2 e 3 mostram o resultado da análise de interação entre os efeitos das aplicações de hormônio e sal nos diversos parâmetros estudados.

Houve interação significativa em relação aos efeitos causados pelas aplicações de hormônio e sal na maioria dos parâmetros de crescimento avaliados (tabelas 2 e 3). Neste caso, é possível analisar hormônio e sal em um mesmo gráfico, desde que uma das variáveis esteja fixa. Para isso utilizou-se análise de variância simples (One-Way). Deste modo foi possível analisar conjuntamente os efeitos das aplicações de BR e das aplicações de sal. Em virtude da semelhança dos resultados encontrados tanto a 200 mM como a 400 mM de sal, na maioria dos parâmetros analisados e considerando-se que plantas cultivadas a 400 mM estão expostas a uma condição maior de estresse, optou-se por apresentar somente dados obtidos com plantas cultivadas nesta última concentração de sal.

#### **4.1.1 Interação entre hormônio e salinidade nos parâmetros de crescimento.**

A tabela 2 mostra o resultado da análise de interação entre os fatores hormônio e sal nos parâmetros de crescimento estudados. Dos 12 parâmetros avaliados, 7 apresentaram interação significativa entre hormônio e sal.

**Tabela 2:** Análise de variância Fatorial para verificação da existência de interação entre os resultados das aplicações das concentrações de brassinosteróide e sal nos parâmetros de crescimento de plantas de *C. cajan*.

| Interação entre concentração de hormônio X concentração de sal |         |
|----------------------------------------------------------------|---------|
| Comprimento da parte aérea                                     | 2.61*   |
| Comprimento da maior raiz                                      | NS      |
| Número de folhas                                               | NS      |
| Massa fresca de raízes                                         | 3.90**  |
| Massa fresca de caule                                          | 7.37*** |
| Massa fresca de folhas                                         | 3.85**  |
| Massa seca de raízes                                           | NS      |
| Massa seca de caule                                            | 3.30**  |
| Massa seca de folhas                                           | NS      |
| Massa seca livre de cinzas                                     | 2.54*   |
| Área foliar                                                    | 5.07*** |
| Suculência                                                     | NS      |

Números seguidos de asteriscos mostram o valor de F e o nível de significância: \* 5%, \*\*1%, \*\*\*0.1%, NS: não houve interação significativa.

#### 4.1.2 Interação entre hormônio e salinidade nos parâmetros bioquímicos.

A tabela 3 mostra o resultado da análise de interação entre os fatores hormônio e sal nos parâmetros de bioquímicos de plantas de *C. cajan*.

**Tabela 3:** Análise de variância Fatorial para verificação da existência de interação entre os resultados das aplicações das concentrações de brassinosteróide e sal nos parâmetros bioquímicos de plantas de *C. cajan*.

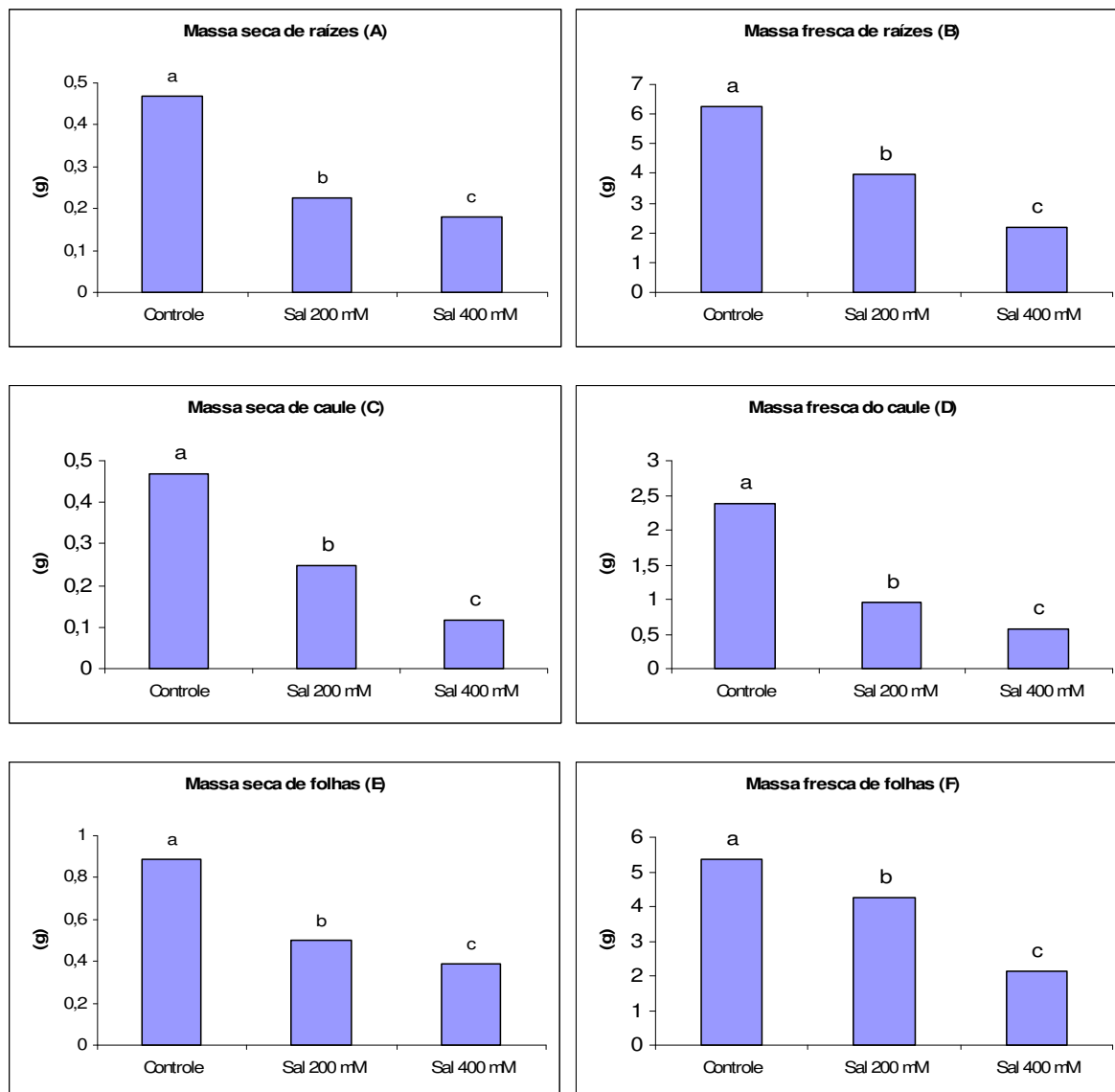
| Interação entre concentração de hormônio X concentração de sal |          |
|----------------------------------------------------------------|----------|
| Clorofila <i>a</i>                                             | 3.13**   |
| Clorofila <i>b</i>                                             | 5.54***  |
| Clorofila total                                                | 4.89***  |
| Carotenóides                                                   | 3,93***  |
| Nitrato                                                        | 5.24***  |
| PRO                                                            | 7.74***  |
| Aminoácidos livres                                             | 11.49*** |
| Proteínas                                                      | 3.16**   |
| Açúcares solúveis totais                                       | 7.87***  |
| Sacarose                                                       | 3.98**   |

Números seguidos de asteriscos mostram o valor de F e o nível de significância: \* 5%, \*\*1%, \*\*\*0.1%.

Todos os parâmetros bioquímicos apresentaram interação entre brassinosteróide e NaCl (Tabela 3).

#### 4.2 Efeito da salinidade em parâmetros de crescimento de plantas de *C. cajan*.

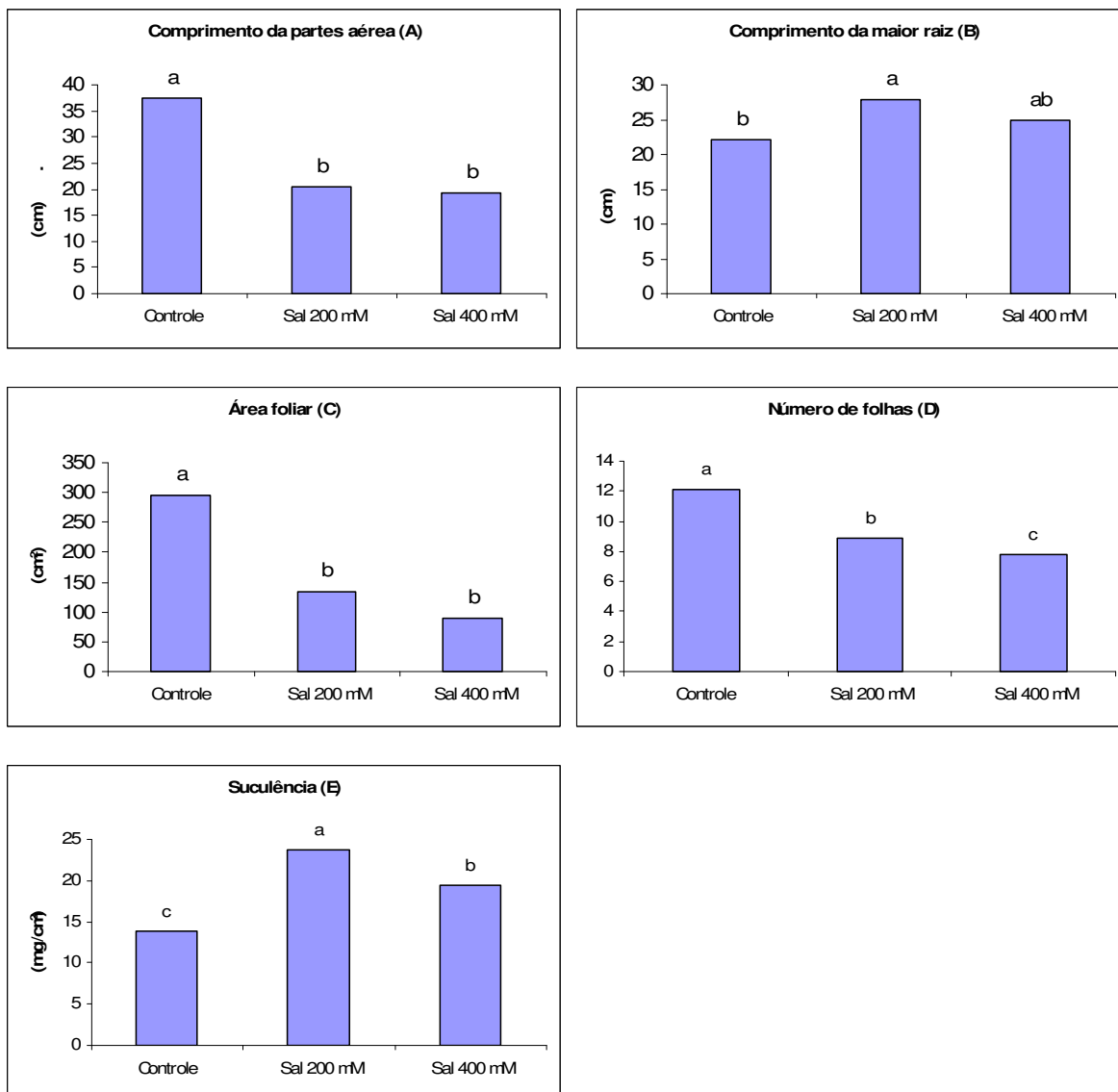
A figura 2 mostra gráficos relativos ao efeito da aplicação de NaCl nas concentrações de 200 e 400 mM, nas massas secas e frescas de raízes (A) e (B), nas massas secas e frescas de caule (C) e (D) e nas massas secas e frescas de folhas (E) e (F), de plantas de *Cajanus cajan*.



**Figura 2:** Efeito da salinidade nas concentrações de 200 e 400 mM de NaCl, nas massas secas e frescas de raízes (A) e (B), nas massas secas e frescas de caule (C) e (D) e nas massas secas e frescas de folhas (E) e (F), de plantas de *Cajanus cajan*. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%.

Analisando-se os gráficos da figura 2 é possível dizer que conforme houve um aumento nas concentrações de sal, houve uma diminuição significativa das médias das massas secas e frescas de raízes, caules e folhas.

A figura 3 mostra gráficos relativos ao efeito da aplicação de NaCl nas concentrações de 200 e 400 mM, nos comprimento da parte aérea (A), no comprimento da maior raiz (B), na área foliar(C), no número de folhas (D) e na suculência (E), de plantas de *Cajanus cajan*.



**Figura 3:** Efeito da salinidade nas concentrações de 200 e 400 mM de NaCl, nos comprimento da parte aérea (A), no comprimento da maior raiz (B), na área foliar (C), no número de folhas (D) e na suculência (E), de plantas de *Cajanus cajan*. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%.

Não houve diferença significativa entre os resultados de aplicação de sal na concentração de 200 e 400 mM em relação ao comprimento da parte aérea. No entanto, os tratamentos com sal levaram a redução das médias em comparação com o tratamento controle (Fig. 3 A). O mesmo padrão de distribuição significativa das médias pode ser visto na análise das áreas foliares (Fig. 3C).

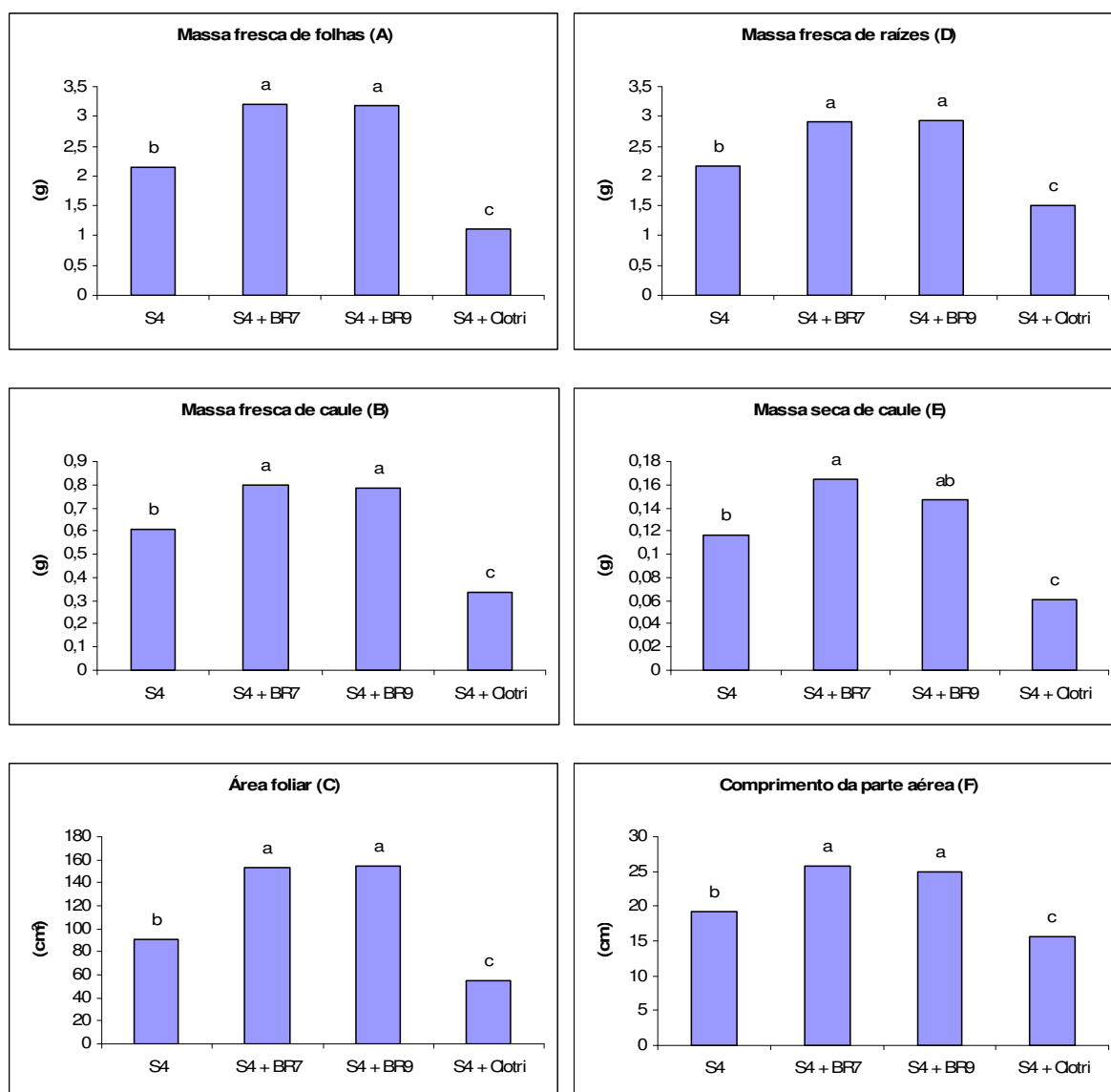
A aplicação de sal na concentração de sal a 200 mM levou a aumento da média de comprimento da maior raiz quando comparada ao controle, já a concentração de 400 mM apresenta aumento em relação ao controle, porém não-significativo (Fig. 3 B). O gráfico de suculência mostra que houve aumento das médias dos tratamentos com sal a 200 e 400 mM em relação ao controle (Fig. 3 E).

É possível verificar-se que as médias do número de folhas diminuíram conforme houve aumento da concentração de NaCl (Fig. 3 D).

#### **4.3 Efeito de brassinosteróide em parâmetros de crescimento de plantas de *C. cajan*, submetidas ao estresse salino.**

##### **4.3.1 Parâmetros onde foram encontradas interações significativas entre hormônio e sal.**

A figura 4 mostra resultados onde foi encontrada interação significativa entre brassinosteróide e sal nos parâmetros referentes à massa fresca de folhas (Fig. 4A), massa fresca de caule (Fig. 4B), área foliar (Fig. 4C), massa fresca de raízes (Fig. 4D) massa seca de caule (Fig. 4E) e comprimento da parte aérea (Fig. 4F). Através da análise dos gráficos é possível verificar-se que a aplicação de hormônio reduziu os efeitos inibitórios do sal a 400 mM em todos os parâmetros. Enquanto que a aplicação de clotrimazol intensificou o efeito do sal nas médias em todos os parâmetros analisados, quando comparadas às plantas tratadas apenas com sal.

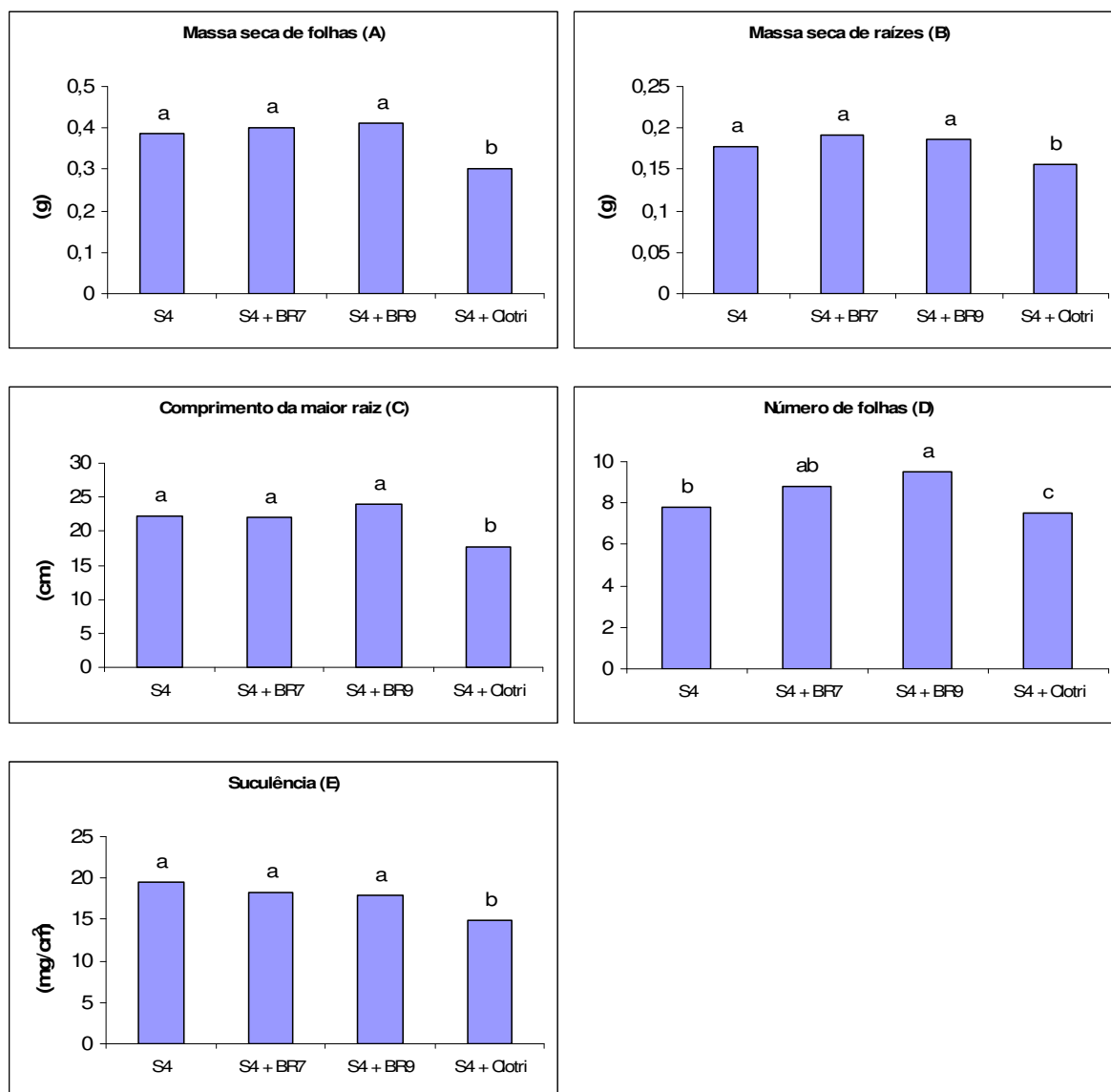


**Figura 4:** Efeito de brassinosteróide nas concentrações de  $10^{-7}$  M (BR7) e  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9) e de clotrimazol a  $10^{-4}$  M (Clotri) nas massas frescas de folhas (A) e caule (B), área foliar (C), massa fresca de raízes (D), massa seca de caule (E) e comprimento da parte aérea (F) de plantas de *Cajanus cajan* cultivadas sob estresse salino (NaCl a 400 mM, S4). Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%.

Houve interação significativa entre hormônio e sal em relação ao parâmetro massa seca livre de cinzas. No entanto, como não houve diferença significativa entre estes resultados e os resultados de massa seca, optou-se por apresentar somente os resultados de massa seca.

#### 4.3.2 Parâmetros de crescimento onde não foram encontradas interações significativas entre hormônio e sal.

A figura 5 mostra resultados dos parâmetros massa seca de folhas e raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas e suculência. Não foi encontrada interação significativa entre hormônio e sal nestes parâmetros.



**Figura 5:** Efeito de brassinosteróide nas concentrações de  $10^{-7}$  M (BR7) e  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9) e de clotrimazol (Clotri) nas massas secas de folhas (A) e raízes (B), comprimento da maior raiz (C) número de folhas (D) e suculência (E) de plantas de *Cajanus cajan* cultivadas sob estresse salino (NaCl a 400 mM, S4). Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%.

Não houve diferença significativa entre as médias da aplicação de hormônio e do tratamento S4 nos parâmetros massa seca de folhas e raízes, comprimento da maior raiz e

suculência. No entanto, a aplicação de clotrimazol reduziu as médias quando comparadas ao tratamento S4 (Fig. 5).

No tratamento S4 + BR9 foi encontrado um número de folhas significativamente maior do que no tratamento S4. Aplicação de clotrimazol reduziu significativamente a média quando também comparada ao tratamento S4 (Fig. 5).

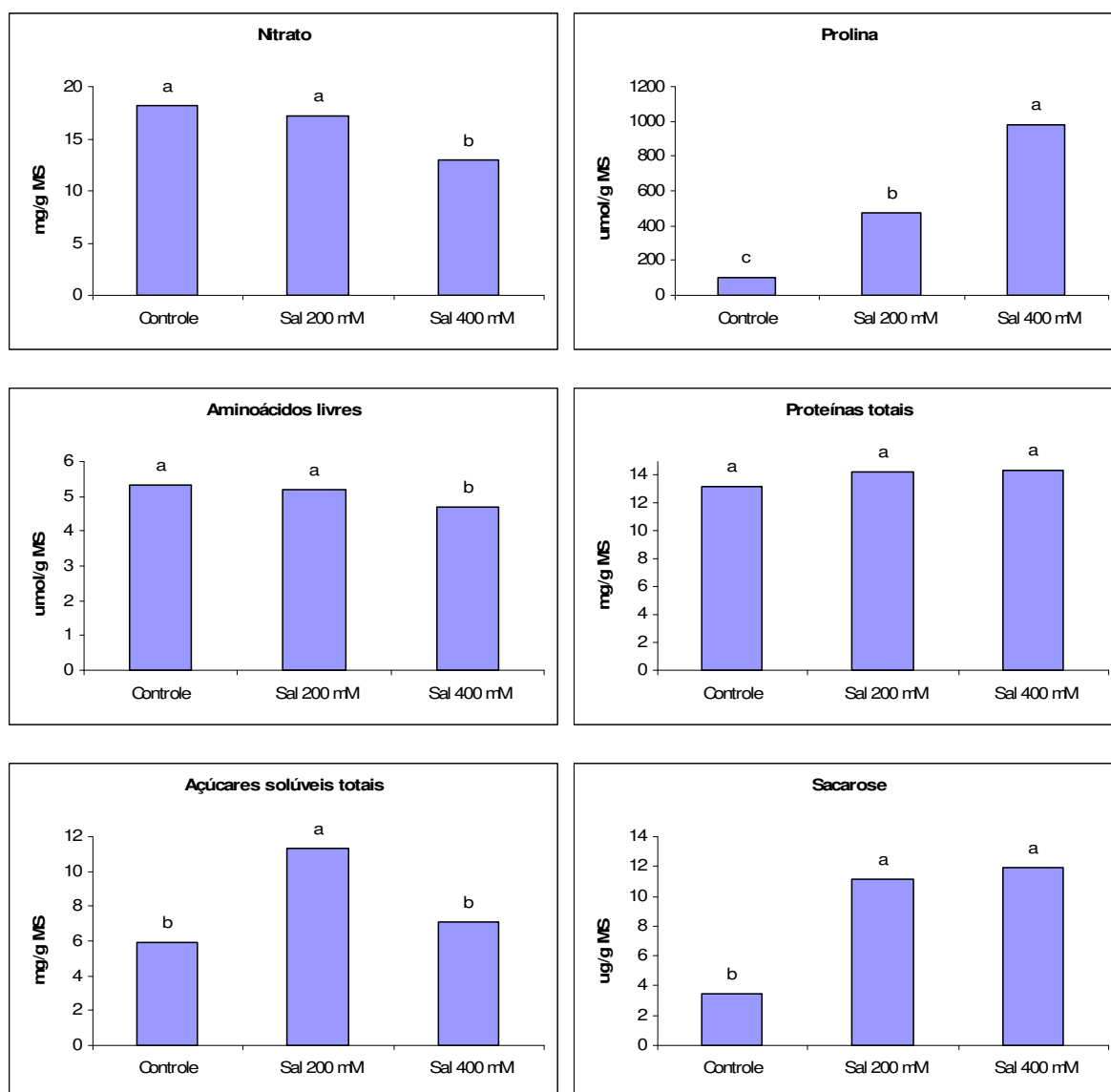
#### **4.4 Efeito da salinidade em parâmetros bioquímicos de plantas de *C. cajan*.**

A figura 6 mostra o efeito de NaCl nas concentrações de 200 e 400 mM em análises de teores de nitrato, PRO, aminoácidos livres, proteínas, açúcares solúveis totais e sacarose em raízes de plantas de *Cajanus cajan*.

Não houve diferença significativa entre as médias do tratamento Controle e sal a 200 mM na análise de nitrato. No entanto a aplicação de sal a 400 mM levou à redução na concentração de nitrato, quando comparada ao controle (Fig. 6).

Conforme houve aumento na concentração de sal, também houve aumento acentuado na concentração de PRO. O tratamento com sal a 400 mM apresentou média, aproximadamente, 10 vezes maior do que no tratamento controle (Fig. 6).

A aplicação de sal a 400 mM provocou diminuição da média de aminoácidos livres quando comparada às médias dos tratamentos controle e sal na concentração de 200 mM, que não diferiram estatisticamente entre si (Fig. 6).



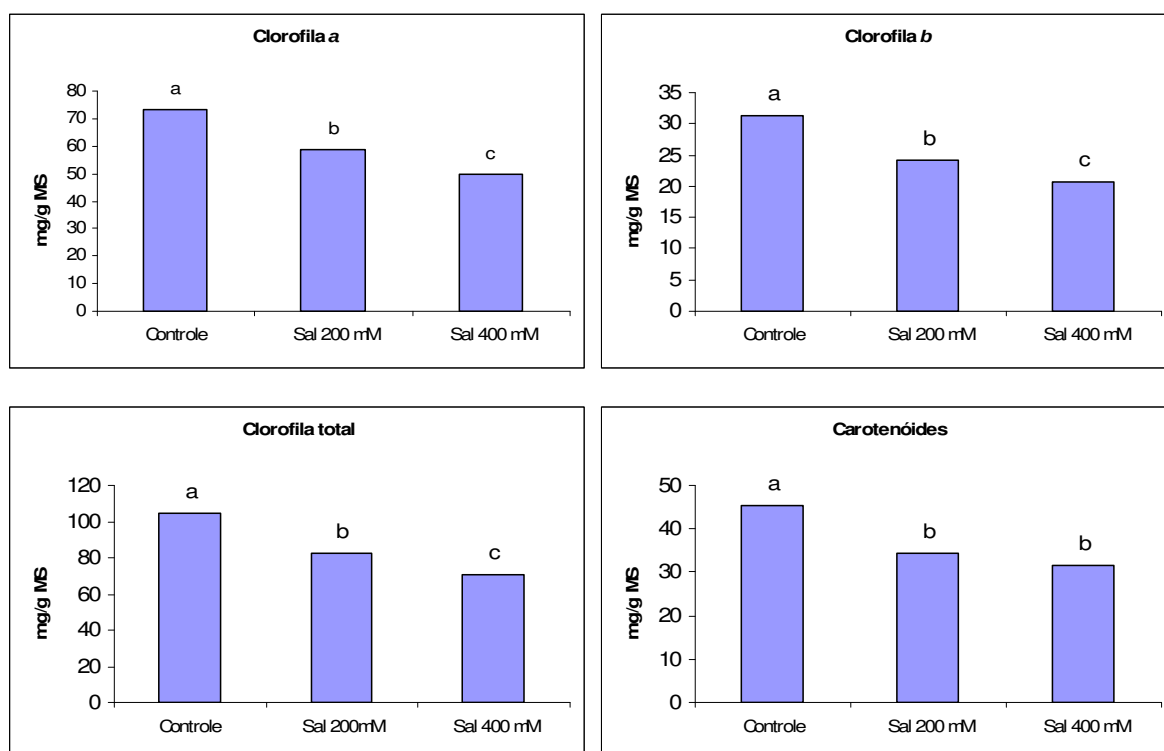
**Figura 6:** Efeito da salinidade nas concentrações de 200 e 400 mM de NaCl em teores de nitrato, prolina, aminoácidos livres, proteínas, açúcares solúveis totais e sacarose em raízes de plantas de *Cajanus cajan*. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%. MS: Massa seca.

Não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos controle e sal a 200 e 400 mM, em relação aos teores de proteínas totais (Fig. 6)

Não houve diferença significativa entre o tratamento com sal a 400 mM e controle, referente a teores de açúcares solúveis totais (Fig. 6). No entanto o tratamento com sal a 200 mM apresentou médias duas vezes maiores que as dos demais tratamentos. Já na análise de sacarose, as aplicações de sal levaram a aumentos expressivos das médias dos tratamentos,

quando comparadas ao controle. No entanto, não houve diferença significativa entre as duas concentrações de sal utilizadas (Fig. 6).

A figura 7 mostra o efeito de NaCl nas concentrações de 200 e 400 mM em teores de clorofilas *a* e *b*, clorofila total e carotenóides, em folhas de plantas de *Cajanus cajan*. Analisando-se os gráficos desta figura, pode-se afirmar que o aumento na concentração de sal levou à diminuição significativa das médias de clorofilas *a* e *b* e clorofila total. Os teores de carotenóides também diminuíram em presença das duas concentrações de sal. No entanto os valores dessas médias não diferiram significativamente entre si (Fig. 7).

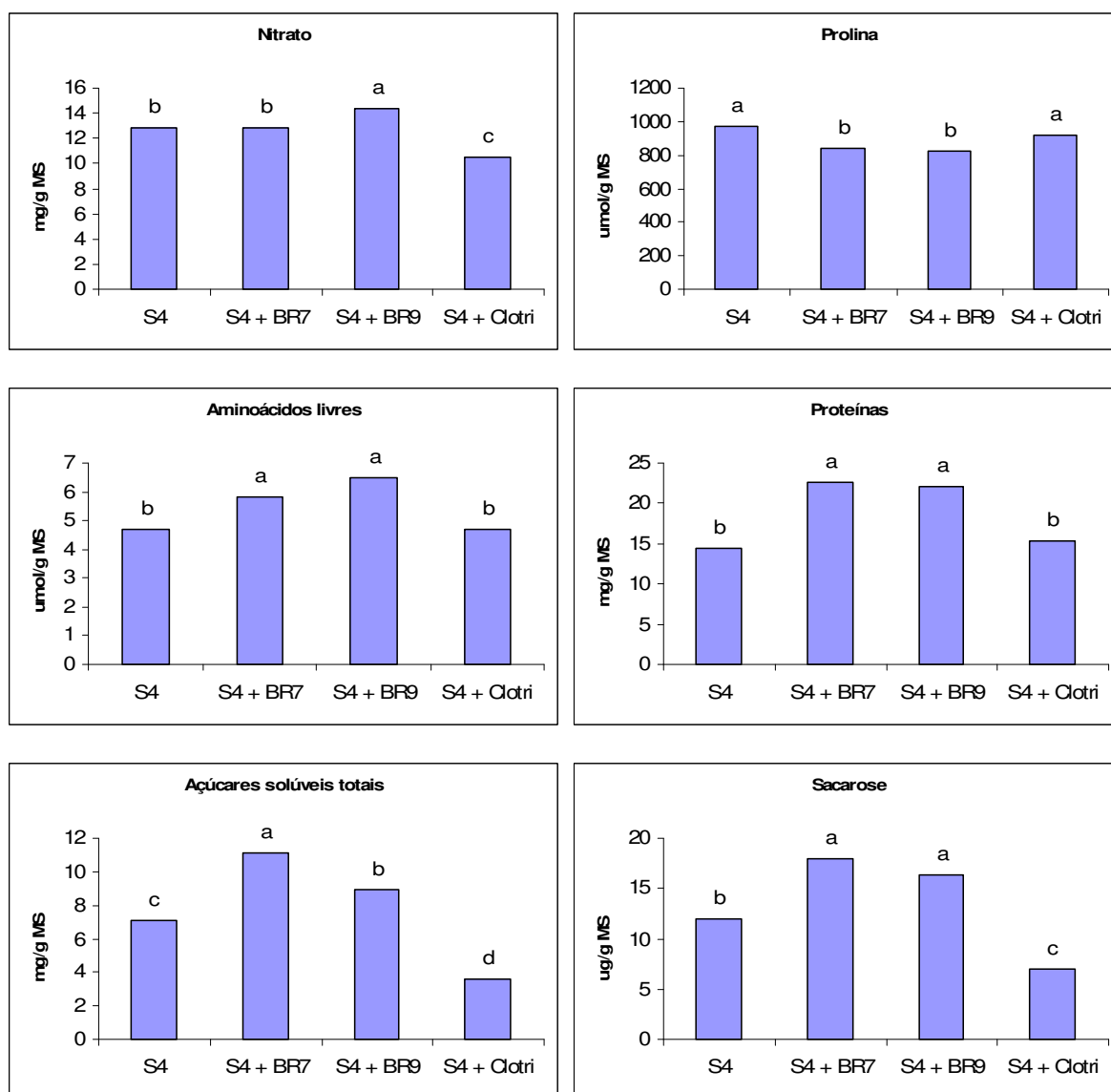


**Figura 7:** Efeito da salinidade nas concentrações de 200 e 400 mM de NaCl em teores de clorofilas *a* e *b*, clorofila total e carotenóides em folhas de plantas de *Cajanus cajan*. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%. MS: massa seca.

#### **4.5 Efeito de brassinosteróide em parâmetros bioquímicos de plantas de *C. cajan*, submetidas ao estresse salino.**

A figura 8 mostra gráficos do efeito da aplicação de brassinosteróide e de clotrimazol em plantas tratadas com sal a 400 mM em relação aos teores de nitrato, PRO, aminoácidos livres, proteínas, açúcares solúveis totais e sacarose, encontrados na raiz.

Analisando-se os gráficos de aminoácidos livres e proteínas da figura 8, é possível verificar-se que os tratamentos onde houve associação de brassinosteróide e sal mostraram aumento das médias quando comparados ao tratamento com sal a 400 mM e ao tratamento com clotrimazol. No entanto não houve diferença significativa entre as concentrações de hormônio, bem como entre tratamento S4 e Clotrimazol (Fig. 8). Padrão semelhante pode ser visto ao analisar-se o gráfico referente à sacarose. No entanto o tratamento com Clotrimazol apresentou menor média do que o tratamento com sal a 400 mM (Fig.8).



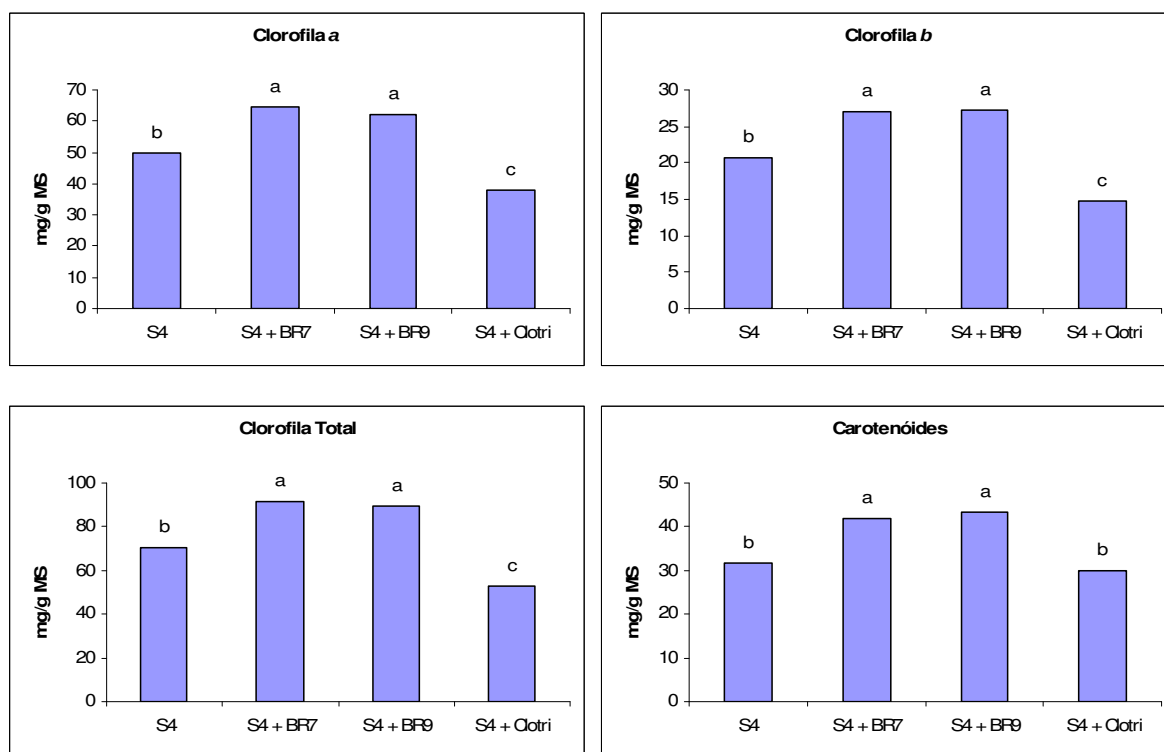
**Figura 8:** Efeito da aplicação de brassinosteróide nas concentrações de  $10^{-7}$  M (BR7) e  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9) e de clotrimazol a  $10^{-4}$  M (Clotri) nos teores de nitrato, prolina, aminoácidos livres, proteínas, açúcares solúveis totais e sacarose em raízes de plantas de *Cajanus cajan*, cultivadas sob estresse salino (NaCl a 400 mM, S4). Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%. MS: massa seca.

Como o teor de PRO aumentou expressivamente na presença de sal (975 umol/g) em relação ao controle sem sal (aproximadamente 100 umol/g, Fig. 6), pode-se afirmar que o brassinosteróide amenizou o efeito do sal neste parâmetro (Fig. 8).

Na análise de nitrato, pode-se verificar que não houve diferença significativa entre os tratamentos S4 e S4 + BR7. No entanto o tratamento S4 + BR9 apresentou média um pouco maior do que o tratamento S4. Já o tratamento S4 + Clotri apresentou média um pouco menor

(Fig. 8), no entanto ao compararmos esses resultados com o tratamento controle da figura 6, é possível verificar a ação inibitória do brassinosteróide em relação efeitos do sal.

A aplicação de BR associado a sal aumentou as médias de açúcares solúveis totais (Fig. 8). Por outro lado a associação de clotrimazol e sal levou à redução da média quando comparada ao tratamento com sal a 400 mM.



**Figura 9:** Efeito de brassinosteróide nas concentrações de  $10^{-7}$  M (BR7) e  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9) e de clotrimazol a  $10^{-4}$  M (Clotri) nos teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides, de folhas de plantas de *Cajanus cajan*, cultivadas sob estresse salino (NaCl a 400 mM, S4). Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%. MS: massa seca.

A figura 9 mostra gráficos do efeito da aplicação de brassinosteróide nas duas concentrações e de clotrimazol em plantas tratadas com sal a 400 mM, em relação aos teores de clorofilas *a*, *b*, total e carotenóides. O mesmo padrão de distribuição das médias foi encontrado nos três gráficos referentes à clorofila. Sob salinidade, as maiores médias podem ser vistas nos tratamentos onde houve aplicação de brassinosteróide, seguidas pela média do tratamento apenas com sal e, por fim, pelo tratamento com clotrimazol. Já para carotenóides,

as maiores médias são encontradas nos tratamentos onde houve aplicação de brassinosteróide, seguidas pelas obtidas no tratamento apenas com sal e pelo tratamento com clotrimazol, que não diferiram significativamente entre si.

#### 4.6 Efeito de brassinosteróide no transporte de aminoácidos em seiva de xilema de plantas de *C. cajan*, submetidas ao estresse salino.

A tabela 4 mostra o efeito de brassinosteróide nas proporções entre os aminoácidos livres transportados no exsudato do xilema de plantas de *C. cajan* submetidas ao estresse salino.

**Tabela 4:** Efeito de brassinosteróide na proporção dos aminoácidos livres (mol % do total) no exsudato do xilema de plantas de *C. cajan*, submetidas a estresse salino. S2: NaCl a 200 mM, S4: NaCl a 400 mM, BR7: brassinosteróide a  $1 \times 10^{-7}$  M, BR9: brassinosteróide a  $0,5 \times 10^{-9}$  M, Clotri: Clotrimazol a  $1 \times 10^{-4}$  M.

|           | ASP   | GLU   | ASN   | SER  | GLN  | ALA  | Outros* |
|-----------|-------|-------|-------|------|------|------|---------|
| Controle  | 13,4  | 17,18 | 39,64 | 2,05 | 2,45 | 1,57 | 23,71   |
| S2        | 8,64  | 7,75  | 32,22 | 2,53 | 1,52 | 4,62 | 42,72   |
| S4        | 8,63  | 7,17  | 33,10 | 2,63 | 0,79 | 2,53 | 45,51   |
| BR7       | 9,30  | 9,07  | 65,02 | 0,97 | 4,20 | 0,74 | 10,70   |
| BR9       | 9,76  | 10,92 | 48,92 | 3,06 | 2,73 | 3,55 | 21,06   |
| Clotri    | 8,41  | 8,61  | 34,21 | 2,35 | 1,42 | 2,27 | 42,73   |
| S2+ BR7   | 6,67  | 5,54  | 42,10 | 1,69 | 0,48 | 1,59 | 41,93   |
| S2+ BR9   | 9,05  | 10,35 | 32,85 | 2,85 | 1,11 | 3,21 | 40,58   |
| S2+Clotri | 7,55  | 7,69  | 28,17 | 2,19 | 0,77 | 2,20 | 51,43   |
| S4+ BR7   | 7,77  | 11,04 | 35,64 | 3,84 | 2,00 | 6,63 | 33,08   |
| S4+ BR9   | 8,89  | 11,00 | 38,90 | 3,63 | 1,99 | 8,49 | 27,10   |
| S4+Clotri | 17,06 | 7,07  | 32,16 | 2,19 | 0,60 | 2,03 | 38,89   |

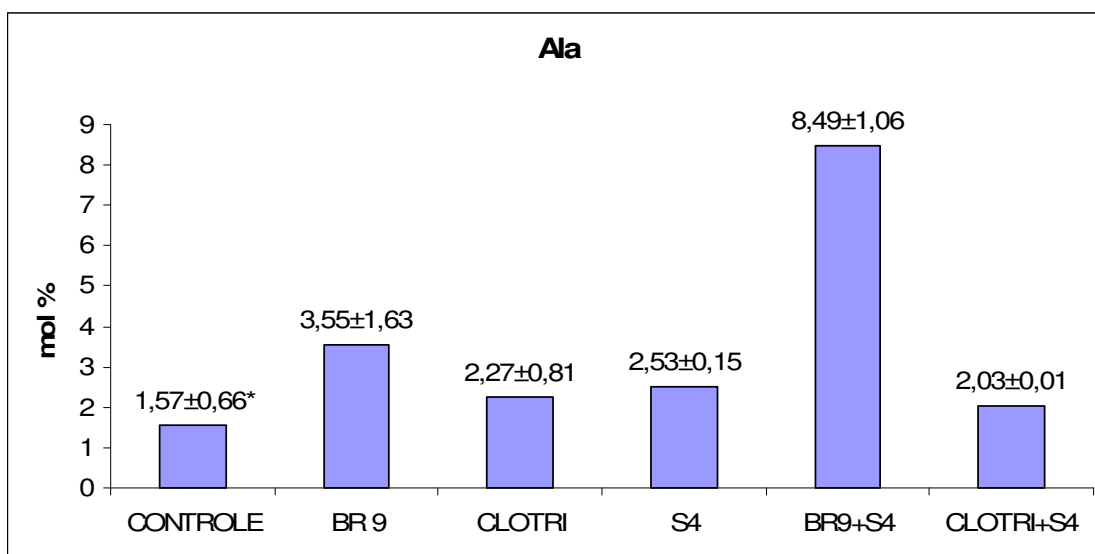
\*Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU, LYS, GABA, porém a soma das médias de suas concentrações era menor do que 2%. Também fazem parte desse valor três aminoácidos não identificados.

Os aminoácidos transportados em maior quantidade no exsudato do xilema foram ASP, GLU e ASN, sendo este último transportado em quantidades expressivamente maiores, quando comparado com os outros aminoácidos. No tratamento BR7 a ASN representou aproximadamente 65% dos aminoácidos transportados em seiva do xilema e no tratamento BR9 chegou a aproximadamente 55%. Nos tratamentos restantes a proporção deste aminoácido

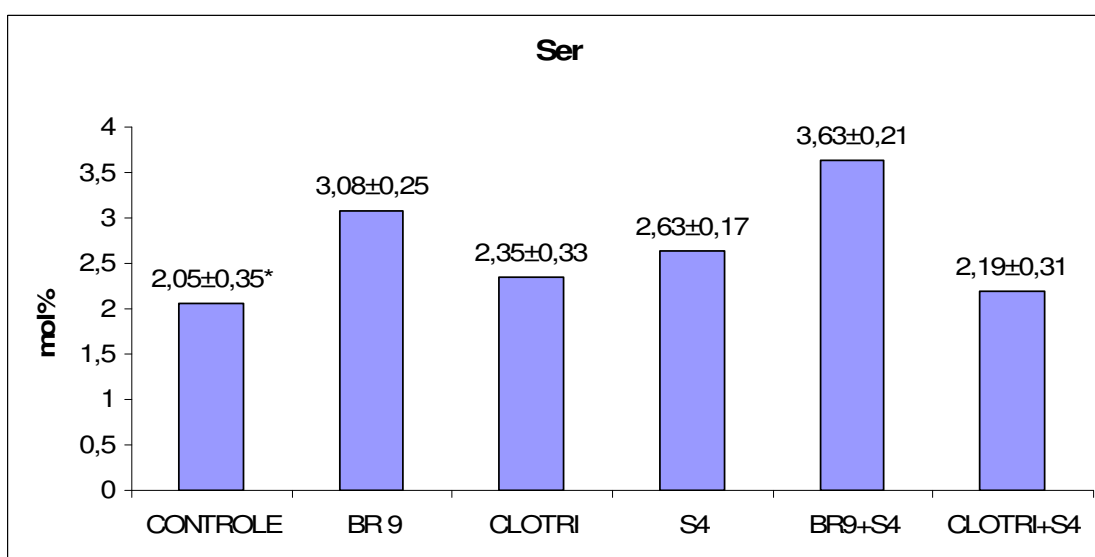
foi sempre maior que 28%. ASP e GLU também apresentaram proporções altas, quando comparados aos aminoácidos restantes.

A proporção da maioria dos aminoácidos transportados diminuiu sob salinidade (tratamentos S2 e S4) e após aplicação do inibidor de síntese de brassinosteróide (Clotri), com exceção de ALA e SER, para os quais é possível verificar uma tendência de aumento em suas proporções sob salinidade (Tab. 4). Em geral, os aminoácidos ALA e SER apresentaram semelhança no padrão de distribuição das médias. A partir da análise conjunta dos gráficos de SER e ALA (Figs. 10 e 11) é possível verificar-se que não houve diferença significativa entre as médias em relação aos tratamentos Controle, Clotri, S4 e Clotri + S4. No entanto, os tratamentos BR9 e BR9 + S4 apresentam médias significativamente superiores em relação aos outros tratamentos.

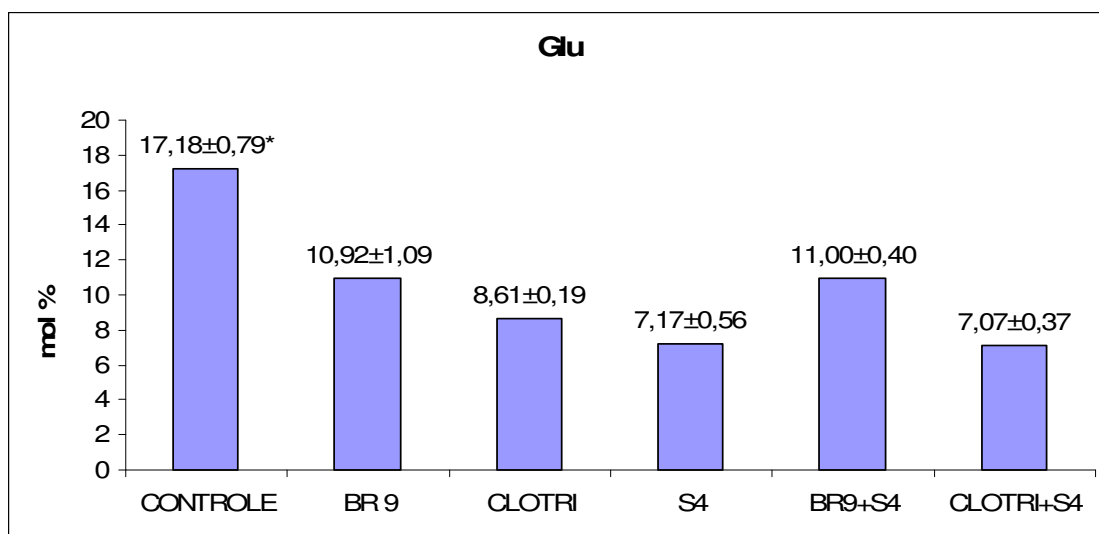
A partir da análise da figura 12 é possível verificar-se que os teores de GLU transportado na seiva do xilema reduziram em todos os tratamentos, quando comparados ao controle. Os tratamentos S4 e Clotri + S4 apresentam as menores médias. O tratamento BR9 + S4 apresentou médias significativamente maiores do que o tratamento S4 (Fig. 12).



**Figura 10:** Efeito de brassinosteróide na concentração  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9), clotrimazol a  $10^{-4}$  M (Clotri) e de NaCl a de 400 mM (S4) nos teores do aminoácido Ala transportado em seiva de xilema de plantas de *Cajanus cajan*. \* Os valores acima dos histogramas representam as médias dos tratamentos seguidas pelo valor do erro padrão.

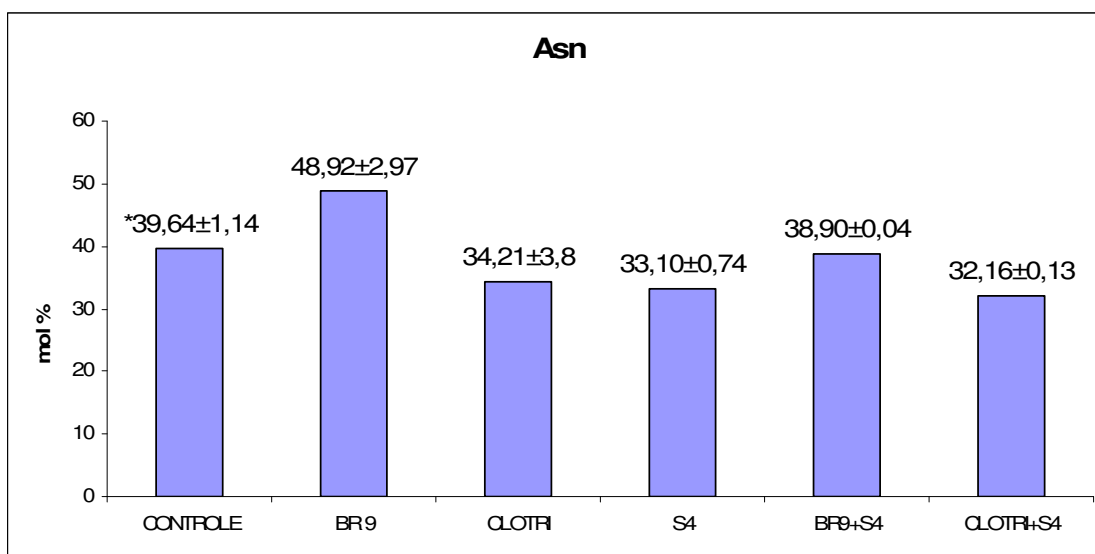


**Figura 11:** Efeito de brassinosteróide na concentração  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9), clotrimazol a  $10^{-4}$  M (Clotri) e de NaCl a de 400 mM (S4) nos teores do aminoácido Ser transportado em seiva de xilema de plantas de *Cajanus cajan*. \* Os valores acima dos histogramas representam as médias dos tratamentos seguidas pelo valor do erro padrão.

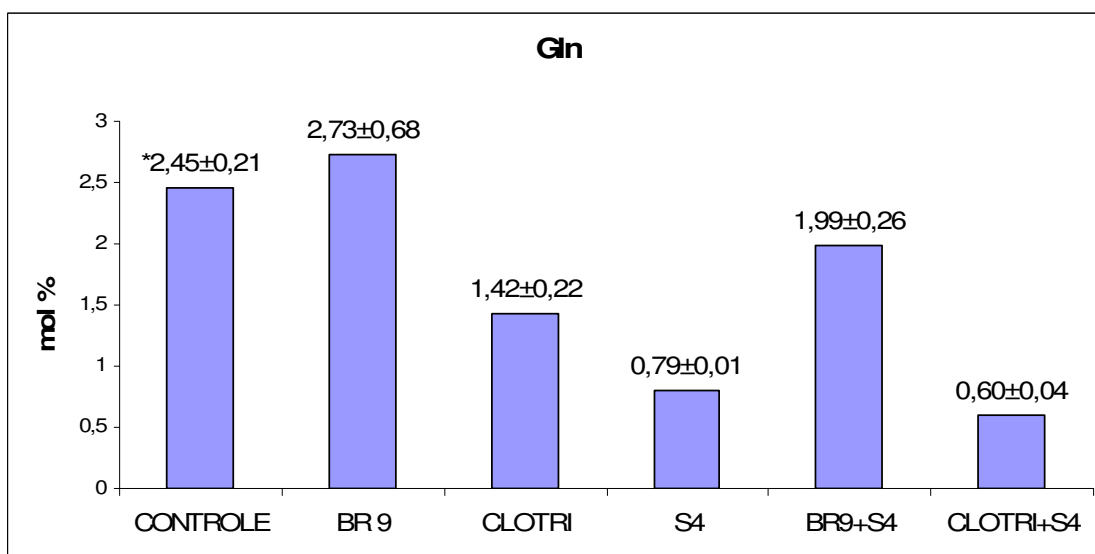


**Figura 12:** Efeito de brassinosteróide na concentração  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9), clotrimazol a  $10^{-4}$  M (Clotri) e de NaCl a de 400 mM (S4) nos teores do aminoácido Glu transportado em seiva de xilema de plantas de *Cajanus cajan*. \* Os valores acima dos histogramas representam as médias dos tratamentos seguidas pelo valor do erro padrão.

Houve semelhança nas distribuições das médias dos aminoácidos ASN e GLN (Figs. 13 e 14) e portanto, os gráficos destes aminoácidos podem ser analisados conjuntamente. A aplicação de brassinosteróide na concentração de  $0,5 \times 10^{-9}$  levou a aumento nas médias das plantas, quando comparadas com as médias do controle. Houve diminuição significativa das médias dos tratamentos Clotri, S4 e Clotri + S4, quando comparadas às dos tratamentos controle. O tratamento BR9 + S4 apresentou médias superiores, tanto nos tratamentos com aplicação de clotrimazol (Clotri e Clotri + S4), quanto no tratamento onde só houve aplicação de sal, tratamento S4 (Figs. 13 e 14).



**Figura 13:** Efeito de brassinosteróide na concentração  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9), clotrimazol a  $10^{-4}$  M (Clotri) e de NaCl a de 400 mM (S4) nos teores do aminoácido Asn transportado em seiva de xilema de plantas de *Cajanus cajan*. \* Os valores acima dos histogramas representam as médias dos tratamentos seguidas pelo valor do erro padrão.



**Figura 14:** Efeito de brassinosteróide na concentração  $0,5 \times 10^{-9}$  M (BR9), clotrimazol a  $10^{-4}$  M (Clotri) e de NaCl a de 400 mM (S4) nos teores do aminoácido Asn transportado em seiva de xilema de plantas de *Cajanus cajan*. \* Os valores acima dos histogramas representam as médias dos tratamentos seguidas pelo valor do erro padrão.

## 5. DISCUSSÃO

A Análise Fatorial empregada neste trabalho mostrou interações significativas entre os fatores hormônio e sal na maioria dos parâmetros de crescimento e em todos os parâmetros bioquímicos. Este tipo de análise permite a interpretação dos resultados de forma mais fácil e direta. Isto é feito analisando-se os inter-relacionamentos ou as interdependências entre as variáveis, de tal modo que estas possam ser descritas convenientemente por um grupo de categorias básicas, chamados fatores. Neste trabalho, os fatores empregados foram hormônio e sal. Este tipo de análise mostrou-se importante em virtude do grande número de tratamentos. Assim, a utilização da análise fatorial permitiu a definição do relacionamento entre ambos os fatores tornando mais simples o entendimento da relação entre cada fator.

Não houve interação significativa nos parâmetros: comprimento da maior raiz, número de folhas, massa seca de raízes e folhas e suculência. Isto significa que, nestes parâmetros, não houve relação entre determinado efeito provocado pela aplicação de hormônio em comparação com determinado efeito provocado pela aplicação de sal. Nos parâmetros restantes, onde houve interação significativa, é possível dizer que há relação de amplificação ou reversão de determinada ação provocada pela aplicação de hormônio e sal nos mesmos indivíduos.

A salinidade diminuiu as médias de massas secas e frescas de caules, folhas e raízes de *C. cajan*. Resultados semelhantes foram encontrados em *Vigna unguiculata* cultivada sob salinidade (Ferreira, 2005). Inúmeros trabalhos indicam que sob estresse salino, diversas espécies apresentam redução em um ou vários destes parâmetros (Seemann & Critchley, 1985; Rawat & Banerjee, 1998; Haddad & Mazzafera, 1999; Flowers & Hajibagheri, 2001; Wei *et al.*, 2003). A massa fresca de folhas de *V. luteola* apresentou redução sob salinidade, enquanto que as massas secas de raiz, caule e folhas não variaram (Ferreira, 2005). Vaidyanathan *et al.* (2003) observaram que em plantas de arroz, houve redução de massa fresca total da planta e

manutenção de massa seca total da planta. Foram observadas reduções das massas secas em cajueiros (Silveira *et al.*, 2003), plantas de feijão-de-corda (Costa *et al.*, 2003), de arroz (Misra *et al.*, 1997) e plantas de soja (El-Samad & Shaddad, 1997; Queiroz, 2007) e calos de soja (Liu & Staden, 2001).

A redução do potencial osmótico da solução do solo provocada pelo sal dificulta a entrada de água nas células da planta e pode estar relacionada com a redução nos valores de massa fresca (Marcelis & Hooijdonk, 1999; Tester & Davenport, 2003). Por outro lado, o baixo potencial osmótico do solo, determina, ao longo do tempo, o fechamento dos estômatos mais cedo, acarretando numa menor taxa fotossintética diária (Prisco, 1980). Uma provável redução da fotossíntese, devida a este fator e à redução da área foliar, aliada à diminuição da disponibilidade de nutrientes (Marcelis & Hooijdonk, 1999), tal como a redução na concentração de NO<sub>3</sub> observada em plantas cultivadas sob salinidade neste trabalho, podem explicar a redução da massa seca.

Houve diminuição do comprimento da parte aérea de plantas de *C. cajan* submetidas à salinidade, o que confirma os resultados de Joshi & Nimbalkar, (1983) nesta mesma espécie e os resultados obtidos com plantas de *Populus tremula* (Evers *et al.*, 1997), *Vigna vexillata* (Okusanya & Oyesiku, 1994) e com plantas de soja (Essa, 2002).

É possível que as reduções na área foliar total sejam devidas à redução no número de folhas. A redução na área foliar em plantas de *C. cajan* mantidas sob salinidade também pode explicar as reduções nas massas secas. O aumento da concentração de sal na solução do solo leva à abscisão de folhas (Greenway & Munns, 1980; Tester & Davenport, 2003) e à redução da área foliar (Alamgir & Ali, 1999). A redução da área foliar pode ser atribuída à senescência ou à reduzida taxa de crescimento (Bernstein *et al.*, 1993). Esta menor área foliar pode ser a principal causa da diminuição do ganho de carbono e do comprimento da parte aérea da planta sob estresse salino, pois leva à menor absorção de dióxido de carbono e à menor interceptação

da luz, diminuindo a fotossíntese (Marcelis & Hooijdonk, 1999; McCree, 1986; Zhu, 2001; Netondo *et al.*, 2004; Righetti *et al.*, 2007), o que pode se refletir numa redução da massa seca. Reduções na área foliar de plantas de *C. cajan*, sob estresse salino, também foram encontradas por Joshi & Nimbalkar, (1983).

Houve aumento nos valores de suculência em plantas de *C. cajan* mantidas com NaCl a 200 mM, quando comparadas ao controle. Resultados semelhantes foram encontrados em *V. unguiculata* cultivadas sob salinidade (Costa *et al.*, 2003). A concentração de 400 mM também levou a aumento significativo da suculência em relação ao controle. No entanto os valores das médias foram menores do que as encontradas no tratamento com sal a 200 mM. Isto, provavelmente, pode ser explicado pelo fato do tratamento com sal a 400 mM ter abaixado muito o potencial osmótico da solução do solo e dificultado a entrada de água nas células da planta, devido à maior concentração de sal.

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. Neste trabalho, as médias do comprimento da maior raiz aumentaram sob salinidade. Okusanya e Oyesiku (1994), relacionaram a tolerância ao sal ao maior crescimento da raiz, explicando que isto levaria a uma maior absorção de água e nutrientes, prevenindo a desidratação.

Nos resultados onde houve interação significativa entre hormônio e sal é possível inferir sobre a ação de brassinosteróide e de seu inibidor de síntese em plantas cultivadas sob estresse salino. Houve redução da ação do sal em função de aplicação de 24-epibrassinolideo, nas duas concentrações, nos parâmetros: massas frescas de folhas, caule e raízes, área foliar, massa seca de caule, e comprimento da parte aérea. Reduções significativas destes parâmetros também foram encontradas após aplicação de inibidor de síntese de brassinosteróide em plantas de *C. cajan*, sob estresse salino. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por

Anuradha & Rao (2001), que também constataram reversão da ação do sal após aplicação do 24-epibrassinolídeo em plantas de arroz, em relação ao comprimento da parte aérea e massas secas e frescas. Resultados semelhantes também foram encontrados por Ozdemir *et al.* (2004), que encontraram recuperação das massas frescas e secas nos tratamentos em que plantas de arroz foram submetidas ao estresse salino associado à aplicação de 24-epibrassinolídeo.

A aplicação de brassinosteróide levou a aumento na área foliar e número de folhas sob estresse salino em *Cajanus cajan*, o que provavelmente aumentou a fotossíntese da planta e pode ter se refletido nas maiores massas encontradas. Assim o brassinosteróide mostrou-se eficiente na manutenção do crescimento de plantas de *Cajanus cajan* submetidas a estresse salino.

Não houve diferença significativa entre as duas concentrações de hormônio e o controle nos parâmetros: massas secas de folhas e raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas e suculência. No entanto, a presença do clotrimazol levou à redução significativa das médias destes parâmetros, evidenciando a importância da síntese deste hormônio para a regulação destes processos e o desenvolvimento normal da planta. Não se pode também descartar a possibilidade de que a duração do experimento não tenha sido suficientemente longa para que os efeitos promotores do hormônio nessas variáveis de crescimento pudessem ser evidenciados.

Sob estresse hídrico, o acúmulo de solutos resulta numa parcial ou total manutenção da turgescência celular (Barlow, 1986). Dos vários osmólitos orgânicos, os açúcares contribuem com cerca de 50% ou mais do potencial osmótico total em glicófitas sob salinidade (Ashraf & Harris, 2004), previnem a desidratação e são fonte de energia para células ativas sob condições salinas (Elavumoottil *et al.*, 2003).

A aplicação de NaCl a 200 mM levou a aumento na concentração de açúcares solúveis totais, neste trabalho. No entanto a aplicação de sal a 400 mM não alterou o conteúdo de

açúcares. Provavelmente isto se deu por se tratar de uma situação de maior estresse, que levou à diminuição da área foliar e número de folhas, possivelmente afetando o processo fotossintético. A provável diminuição na taxa fotossintética pode ter levado a esta diminuição na concentração de açúcares solúveis em relação ao tratamento com 200 mM de sal.

Ashraf, (1994) também apresenta dados relativos a aumento dos teores de açúcares solúveis em plantas de *C. cajan*, sob salinidade. Em adição, inúmeros trabalhos demonstram que sob estresse salino há acréscimo na concentração de açúcares solúveis em outros tipos de culturas (Torrecillas *et al.*, 1994; Leidi & Saiz, 1997; Elavumoottil *et al.*, 2003; Martínez-Ballesta *et al.*, 2004), especialmente em espécies sensíveis ao excesso de sais no meio externo (Torrecillas *et al.*, 1994).

O conteúdo de sacarose aumentou nas plantas submetidas a estresse salino. A sacarose tem sido indicada como o principal tipo de açúcar a atuar na manutenção da turgescência celular (Perry *et al.*, 1987), além de proteger os cloroplastos contra injúrias durante a dessecação (Greenway & Munns, 1980), em situações de estresse hídrico e salino.

A salinidade acelera a senescência (O'Leary & Prisco, 1970). Os cloroplastos constituem-se em um dos primeiros sítios de catabolismo da senescência foliar (Smart, 1994). A salinidade pode afetar a concentração de clorofilas em folhas por inibir sua síntese, ou por acelerar sua degradação (Reddy & Vora 1986). A diminuição nos teores de pigmentos fotossintéticos de *C. cajan*, sob estresse salino, apresentada neste trabalho, também foi observada em plantas de feijão (O'Leary & Prisco, 1970), em plantas de feijão mungo (Zayed & Zeid, 1997) e em plantas de sorgo (Netondo, *et al.*, 2004). Possivelmente, a redução dos pigmentos fotossintéticos afetou a taxa fotossintética, causando a redução de crescimento sob salinidade encontrada neste trabalho.

Foi observada redução na concentração de nitrato nas raízes após aplicação de sal na concentração de 400 mM. A concentração de 200 mM de NaCl não foi suficiente para

comprometer a absorção de nitrato pelas raízes. O comprometimento da absorção de nitrato pode ocorrer em consequência da interferência exercida pelo  $\text{Cl}^-$  sobre alguns tipos de transportadores da membrana das células das raízes (Silveira, *et al.*, 2001; Rubinigg, *et al.*, 2003). Reduções na concentração de nitrato também foram observadas em cajueiro (Silveira *et al.*, 2003) e plantas de feijão-de-corda (Silveira *et al.*, 2001), sob salinidade.

O comprometimento da absorção de nitrato pode acarretar numa diminuição na concentração de aminoácidos livres totais (Rubinigg *et al.*, 2003; Carillo, *et al.*, 2005). Provavelmente, esta foi a causa da diminuição na concentração de aminoácidos livres encontrada neste trabalho no tratamento com NaCl a 400 mM, já que esta mesma concentração de sal provocou redução na concentração de nitrato. Com a diminuição da absorção de nitrato pode haver uma redução da atividade da redutase do nitrato, 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).

Houve um aumento expressivo na concentração de PRO em raízes, paralelamente ao aumento da salinidade, principalmente na concentração de sal a 400 mM, em que o aumento foi cerca de 10 vezes maior em relação ao controle. O aumento de PRO ocorre em resposta a diversos tipos de estresse, evidenciando que esta não é uma resposta específica da planta à salinidade. Aumentos dos teores deste aminoácido foram observados em plantas mantidas sob hipóxia (Reggiani, *et al.*, 1988) e sob estresse hídrico (Ashraf, 1994). Assim, esse aumento pode ser visto como apenas um indicador de estresse. Por outro lado, alguns autores atribuem à PRO um papel como soluto compatível, atuando como substância osmoprotetora em plantas submetidas à salinidade (Yazici *et al.*, 2007). Pérez-Alfocea *et al.* (1994) atribuem à PRO um possível papel na redução da acidificação do citosol, sob estresse salino. Esses resultados coincidem com os relatados tanto para *C. cajan* (Ashraf, 1994), como 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). Um aumento na síntese *de novo* de PRO poderia explicar a elevação deste aminoácido sob salinidade, devido ao aumento da expressão da  $\Delta^1$ -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 do aminoácido, em consequência da inibição da PRO oxidase (Misra & Gupta, 2005).

Apesar de ter havido diminuição na concentração de aminoácidos livres, não houve redução da concentração de proteínas solúveis, sob salinidade. A estabilidade na concentração de proteínas de plantas de *C. cajan*, sob estresse salino, também foi observada por Ashraf (1994). Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de feijão-de-corda (Costa *et al.*, 2003) e em plantas de eucalipto (Ashraf, 1994). É possível que a estabilidade protéica tenha se mantido em função do tempo experimental, isto é, talvez o tempo de experimento não tenha sido suficientemente longo para promover a proteólise, que é comum em estresse salino. Outra possibilidade é ter havido um aumento na síntese de proteínas específicas de estresse (Callis, 1995; Forsyth & Shewry, 2002), o que justificaria a manutenção da concentração das proteínas solúveis totais, sob salinidade.

Aumentos na fixação de nitrogênio e na atividade da redutase do nitrato foram observados respectivamente por Vardhini & Rao (1999) e Anuradha & Rao (2001), em leguminosas e arroz submetidos à salinidade após aplicação de 24-epibrassinolídeo. Estes autores discutem que estas mudanças podem ter levado a aumentos nos teores de proteínas solúveis. Neste trabalho, houve aumento nos teores de nitrato, aminoácidos livres e proteínas solúveis nos tratamentos com aplicação de brassinosteróide sob salinidade, quando comparados com os tratamentos onde só houve aplicação de sal, indicando que brassinosteróides reduzem os efeitos inibitórios do sal no metabolismo de proteínas (Anuradha

& Rao, 2001). Resultados semelhantes foram observados em plantas de cevada submetidas a estresse hídrico (Sairam, 1994).

Os teores de açúcares solúveis totais e de sacarose aumentaram em presença de brassinosteróide quando as plantas foram submetidas à salinidade. A inibição da ação da salinidade em alguns parâmetros, como por exemplo, a maior área foliar e o aumento no número de folhas, podem ter favorecido um aumento na taxa fotossintética, o que explicaria os altos teores de açúcares e sacarose encontrados nessas plantas após aplicação de brassinosteróide, em comparação àquelas onde somente foi aplicado sal. Vardhini & Rao (1997) também observaram aumento no conteúdo de açúcares após aplicação de 24-epibrassinolídeo e discutiram que este aumento também se devia à elevação da fotossíntese causada pelo hormônio. Embora tenha havido aumento da concentração de açúcares solúveis totais sob sal a 200 mM, foi encontrada uma concentração menor de clorofila nessa mesma concentração, indicando uma possível redução na fotossíntese. Uma possível explicação para o aumento da concentração de açúcares solúveis totais, mesmo com uma provável redução da fotossíntese, pode estar no fato da salinidade levar a aumento na degradação de amido (Liska *et al.*, 2004). É possível ainda, que mesmo com redução da fotossíntese, o transporte de açúcares das folhas para as raízes tenha aumentado diante da necessidade da planta se adaptar a condição de estresse salino, elevando a concentração de solutos compatíveis.

A promoção de crescimento, verificada após aplicação do brassinosteróide, foi associada com concentrações altas de clorofilas em plantas de feijão (Krissek & Mandava, 1983) e de tritcale (Kalituho *et al.*, 1996). Anuradha & Rao (2003) observaram decréscimo nos teores de clorofila em plantas de arroz tratadas com sal e aumento significativo destes após aplicação de brassinosteróides. Neste trabalho, plantas tratadas com brassinosteróide também apresentaram maiores concentrações de pigmentos fotossintéticos e isso pode ser uma das razões para a estimulação do crescimento de *C. cajan* sob estresse salino, em relação às

plantas crescendo sob salinidade e que não receberam o hormônio. Brassinosteróides preservam aparelho fotossintético de plantas cultivadas sob estresse. Plantas de cevada cultivadas em NaCl a 500 mM apresentaram cloroplastos íntegros quando pré-tratadas com brassinosteróide (Kulaeva *et al.*, 1991).

Os teores de PRO aumentaram quando as plantas de *C. cajan* foram submetidas à salinidade. No entanto, nos tratamentos onde houve aplicação de brassinosteróide associada à salinidade, os teores deste aminoácido abaixaram, indicando que a ação dos brassinosteróides na adaptação das plantas ao estresse salino não deve ocorrer diretamente via aumento dos teores de PRO. Os mesmos resultados foram encontrados em plantas de arroz por Ozdemir *et al.* (2004), que discutiram que a PRO tem sido considerada como fonte de carbono e nitrogênio para uma rápida recuperação a estresses em geral, pelo potencial na estabilização de membranas e de algumas macromoléculas, bem como por sua ação na neutralização de radicais livres.

Trabalhos envolvendo transporte de aminoácidos em condições de salinidade são escassos na literatura. Em adição, não existem relatos na literatura do estudo do transporte de aminoácidos em plantas submetidas à salinidade e aplicação de brassinosteróides, sendo, portanto, inéditos os dados apresentados neste trabalho.

O metabolismo do nitrogênio é muito dinâmico. Determinado aminoácido pode ser altamente produzido em raízes e prontamente transportado. A dosagem deste aminoácido na raiz pode mostrar uma concentração baixa e levar a conclusões equivocadas, pois o tamanho do “pool” não reflete necessariamente o “turnover” do aminoácido. A dosagem deste mesmo aminoácido no xilema elucidaria com maior exatidão as relações entre processos metabólicos que ocorrem em diversas partes da planta, pois é dependente da dinâmica do “turnover”.

Além do papel na síntese protéica, os aminoácidos apresentam funções essenciais no metabolismo primário e secundário das plantas. Alguns aminoácidos têm a função de

assimilação e transporte de nitrogênio de fontes a drenos, outros são precursores de hormônios e compostos envolvidos em defesa de plantas (Buchanan *et al.*, 2000). Assim a síntese direta e indireta, bem como o transporte destes aminoácidos, controla vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal.

GLU, GLN, ASP e ASN são ditos aminoácidos “N-transportadores”. Estes compostos estão envolvidos na transferência de nitrogênio a partir de órgãos fonte até tecidos dreno e na síntese de compostos de reserva para uso no crescimento, defesa e processos reprodutivos. São os aminoácidos mais transportados na seiva de xilema e produtos primários da assimilação do nitrogênio (Buchanan *et al.*, 2000).

O nitrogênio assimilado em GLU e GLN é rapidamente disseminado para diversos tecidos das plantas. Estes aminoácidos podem ser transformados em ASP e ASN. A ASN é relativamente inerte, servindo primariamente como transportador de nitrogênio e composto de reserva (Buchanan *et al.*, 2000). Neste trabalho a ASN foi o aminoácido mais transportado na seiva de xilema. Os aminoácidos ASP, GLU, SER e ALA também foram transportados em quantidades significativas. O aminoácido encontrado em maior abundância no exsudato do xilema de plantas de soja não noduladas foi a ASN (McClure & Israel, 1979). Puiatti e Sodek (1999), Souza e Sodek (2003) Thomas *et al.* (2005) submeteram plantas de soja à hipoxia (por alagamento do sistema radicular) e observaram que a ASN é a principal forma de transporte de nitrogênio nas plantas que cresceram em meio com nitrato. Observaram também, que quando as plantas foram colocadas sob estresse, houve redução na concentração de ASN e discutiram a possibilidade da diminuição da sua concentração ter ocorrido devido à interconversão deste aminoácido em ALA. Estes resultados estão de acordo com os apresentados neste trabalho, já que a concentração de ASN diminuiu em presença de estresse salino, enquanto que a concentração de ALA aumentou. É provável que a redução observada na proporção de ASN tenha ocorrido em função de interconversão em ASP, com a conseqüente liberação de  $\text{NH}_4^+$ ,

que pode ter sido reassimilado pelo sistema GS/GOGAT. No entanto, também existe a possibilidade de ter havido redução na formação de ASN sob salinidade, em função da diminuição da assimilação de nitrato mostrada neste trabalho.

Os aminoácidos 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.*, 2000; Puiatti & Sodek, 1999; Bouché *et al.*, 2003; Souza & Sodek, 2002; Ashraf & Harris, 2004). A salinidade pode ter afetado a respiração oxidativa, o que aumentaria os níveis de ALA e SER, como no caso de estresse por hipóxia (Puiatti e Sodek, 1999). No entanto não existe evidencia de que o sal afeta a respiração oxidativa.

A partir da análise dos resultados referentes aos aminoácidos GLU, ASN e GLN, é possível verificar-se que com a aplicação de brassinosteróide, os padrões destes aminoácidos voltaram a ser semelhantes aos encontrados nas plantas controle, já que houve expressiva diminuição na proporção destes aminoácidos sob salinidade. Aplicações de inibidor de síntese de brassinosteróide resultaram novamente em reduções nas concentrações destes aminoácidos, reforçando as indicações de que o 24-epibrassinolídeo está relacionado com o aumento destes aminoácidos na seiva do xilema. Não existem relatos na literatura a respeito de algum possível mecanismo de ação de brassinosteróides em relação à síntese e transporte de aminoácidos. No entanto, certamente há envolvimento do hormônio com estes fatores, já que a aplicação de brassinosteróide restabeleceu as proporções destes aminoácidos, quando comparadas ao controle, resultando, possivelmente, em alterações metabólicas que levaram ao maior crescimento de plantas de *C. cajan* observados nos tratamentos com aplicação do hormônio.

## 6. CONCLUSÕES

A salinidade afetou os parâmetros de crescimento, bioquímicos e padrão dos aminoácidos transportados em plantas de *Cajanus cajan*, sendo que a concentração maior de NaCl (400 mM) provocou maiores alterações.

Não houve diferença em relação à eficiência das duas concentrações de brassinosteróide utilizadas, com exceção dos teores de nitrato e açúcares solúveis totais. O clotrimazol mostrou-se eficiente na inibição dos efeitos provocados por brassinosteróides em todos os parâmetros estudados.

A aplicação de brassinosteróide amenizou o efeito do sal na maioria dos parâmetros de crescimento, dos parâmetros bioquímicos e no padrão de aminoácidos transportados em plantas de *Cajanus cajan*, submetidas a estresse salino.

## 7.BIBLIOGRAFIA CITADA

- 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.
- Alamgir A.N., Alli M.Y. 1999. Effect of salinity on leaf pigments sugar and protein concentrations and chloroplast ATPase activity of rice (*Oryzasativa* L.). Bangladesh J. Bot. 28: 145-149.
- Allison S.E., Brown, J.W. Hayaward, H.E. Richards, L.A. Bersnstein, L. Fireman, M. Pearson, G.A., Wilcox, L.V., Bower, C.A., Haaatcher, J.T. & Reeve, R.C., 1985. Suelos Salinos y Sodicos. L.A. Richards, Editor, 1985. 172pp.
- Amabile R.F., Fancelli A.L. & Carvalho A. M. 2000. Comportamento de espécies de adubos verdes em diferentes épocas de semeadura e espaçamento na região dos cerrados. Pesq. Agropec. Bras. 35: 47-54.
- Amarante L., Lima J. D. & Sodek L. 2006. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. Env. Exp. Bot. 58: 123-129.
- Amzallag G. N. & Vaismam J. 2006. Influence of brassinosteroids on initiation of the root gravitropic response in *Pisum sativum* seedlings. Biol. Plant. 50: 283-286.
- Anuradha S. & Rao S. S. S. 2001. Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Growth Regul. 33 (2): 151-153.
- Anuradha S. & Rao S. S. S. 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.

- Arnon D. I. 1949. Cooper enzyme in isolated chloroplasts. 1. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1-15.
- Ashraf M. 1994. Salt tolerance of pigeon pea (*Cajanus-cajan* (L.) Millsp) at 3 growth-stages. Ann. Appl. Biol. 124:153-164.
- Ashraf M. & Harris, P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Sci. 166:3-16.
- Bach T, J. 1985. Selected natural and synthetic enzyme inhibitors of sterol biosynthesis as molecular probes for *in vivo* studies concerning the regulation of plant growth. Plant Sci. 39: 183-187.
- Barlow E.W.R. 1986. Water relations of expanding leaves. Aust. J. Plant Physiol. 13: 45-58.
- Basu S., Gangopadhyay G. & Mukherjee, B.B. 2002. Salt tolerance in rice in vitro: Implication of accumulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and proline. Plant Cell Tissue Organ Cult. 69:55-64.
- Bates L.S. & Waldren, R. P. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil, 39: 205-207.
- Bernstein N.; Silk W.K. & Läuchli, A. 1993. Growth and development of sorghum leaves under conditions of NaCl stress. Spatial and temporal aspects of leaf growth inhibition. Planta 191: 433-439.
- Bieleski L. R. & Turner N. A. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and cromatography. 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 succinyl-semialdehyde dehydrogenase of the  $\gamma$ -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(1): 248-254.
- Buchanan, B. B., Gruissem & W., Jones, R. L. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. 1367p.
- 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.
- Carvalho M. A. C., Athayde M. L. F., Soratto R. P., Alves M. C. & Sá M. E. 2004. Soja em sucessão a adubos verdes no sistema de plantio direto e convencional em solo de Cerrado. *Pesq. Agrop. Bras.* 39: 1141-1148.
- Casagrandi D. A., Canniatti-Brazaca S. G., Salgado J. M., Pizzinatto A. & Novaes N. J. 1999. Análise tecnológica, nutricional e sensorial de macarrão elaborado com farinha de trigo adicionada de farinha de feijão-guandu. *Rev. Nutr.* 12: 137-143.
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L., E. & Youngs V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6:71-80.
- Cerezo M., Garcia-Agustin P., Serna M.D. & Primo-Millo E. 1997. Kinetics of nitrate uptake by Citrus seedlings and inhibitory effects of salinity. *Plant Sci.* 126:105-112.
- Clouse S. D. & Sasse, J. M. 1998. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 427-451.

- Corzo O. & Fuentes A. 2004. Moisture sorption isotherms and modeling for pre-cooked flours of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. millsp) and lima bean (*Canavalia ensiformis*). J. Food Engin. 65:443-448
- 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. Brasil. Bot. 26: 289-297.
- Debez A., Hamed K.B., Grignon C. & Abdelly C. 2004. Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *Cakile maritima*. Plant Soil 262: 179-189.
- 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.
- Elavumoottil O.C., Martín J.P. & Moreno M.L., 2003. Changes in sugars, sucrose synthase activity and proteins in salinity tolerant callus and cells suspension cultures of *Brassica oleraceae* L. Biol. Plant. 46: 7-12.
- 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.

- FAO, 2000. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils, Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agl/spush/intro.htm>.
- Ferreira M.C.C. 2005. Efeito do sal no crescimento e metabolismo de *Vigna unguiculata* L. Walp e *Vigna luteola* (Jacq.) Benth. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- Flores P., Botella M.A, Martínez V. & Cerdá, A., 2002. Response 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. & Yeo A. R. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? Australian J. Plant Physiol. 22: 875-884.
- 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. Environm. Exp. Bot. 47: 39-50.
- Giomo G. S., Razera L. F. & Nakagawa J. 2001. Espaços para produção de sementes de guandu em semeadura tardia. Bragantia 60: 121-126.
- 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.
- Handel, V. E. 1968. Direct microdetermination of sucrose. Analytical Biochemistry, 22:280-283.
- Hasegawa P.M. Bressan R.A., Zhu J. K. & Bohnert H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 51:463-499.
- Heinrichs R., Vitti G.C., Moreira A., Figueiredo P. A. M., Fancelli A L.& Corazza E. J. 2005. Características químicas de solo e rendimento de fitomassa de adubos verdes e de grãos de milho, decorrentes do cultivo consorciado. Rev. Bras. Ciênc. Solo 29:71-79.
- Herralde F., Biel C., Save R., Morales M.A, Torrecillas A., Alarcon J.J. & Sanchez-Blanco MJ. 1998. Effect of water and salt stresses on the growth, gas exchange and water relations in *Argyranthemum coronopifolium* plants. Plant Sci. 139:9-17.
- Hiscox J.D. & Israelstam G.F. A. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can. J. Bot. 57: 1332-1334.
- Hoagland D.R. & 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.
- Jacobsen T. & Adams R. M. 1958. Salt and silt in ancient Mesopotamian agriculture. Science 128, 1252.
- 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.
- Jeschke W. D., Klagges S. & Bhatti A. S. 1995. Collection and composition of xylem sap and root structure in two halophytic species. *Plant and Soil* 172: 97-106.
- Joshi S. & Nimbalkar J.D. 1983. Effect of salt stress on growth and yield in *Cajanus cajan* L. *Plant and Soil* 74: 291-294.
- Kalituho L. N., Chaika, M. T., Mazhul, V.M. & Khripach, V. A. 1996. Effect of 24-epibrassinolide on pigment apparatus formation. *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.* 23-36-40.
- 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.
- Khripach V. A., Zhabinskii V. N. & Groot A. E. 1999. *Brassinosteroids-A new class of plant hormones*. Academic Press, San Diego, 455 p.
- 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.
- Krizek D. T. & Mandava B. N. 1983. Influence of spectral quality on the growth response of intact bean plants to brassinosteroid, a growth-promoting steroidal lactone. Stem elongation and morphogenesis. *Physiol. Plant.* 57:317–323.
- Kulaeva O. N., Burkanova E. A., Fedina A. B., Khokholova V. A., Bokebayeva G. A., Vorbrodt, H. M., & Adam G. 1991. Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant cell ultra structure under stress condition. IN: *Brassinosteroids. Chemistry,*

- Bioactivity and Applications. ACS Symposium Series (Cutler, H. G., Yokota, T. & Adam G.), American Chemical Society, Washington, 474:312-319.
- Larcher W. 2000. Ecofisiologia vegetal. Rima, São Carlos, 531p.
- Leidi E.O. & Saiz J.F., 1997. Is salinity tolerance related to Na accumulation in Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) seedlings? Plant Soil 190: 67-75.
- 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.
- Lichtenthaler B.K. & Welburn A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Transact. 11:591-592.
- Lima J. D. & Sodek L. 2003. N-stress alters aspartate and asparagine levels of xylem sap in soybean. Plant Sci. 165(3): 649-656.
- Liska A. J., Shecshenko A., Pick U. & Katz A. 2004. Enhanced photosynthesis and redox production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. Plant Phys. 136:2806-2817.
- 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.
- 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.
- Lohaus G., Hussmann M., Pennewiss K., Schneider 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.

- Marcelis L.F.M. & Hooijdonk J.V. 1999. Effect of salinity on growth, water use and nutrient use in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil* 215: 57-64.
- Martínez-Ballesta M.C., Martínez V. & Carvajal M., 2004. Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. *Environm. Exp. Bot.* 52: 161-174.
- McClure P. R. & Israel D. W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64:411-416
- McCree J.K. 1986. Whole-plant carbon balance during osmotic adjustment to drought and salinity stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:33-43.
- 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., Mishra 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 chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176:367-388.
- Munns R. & Termaat A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 143-160.
- 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.
- Neumann P. 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant Cell Environ.* 20: 1193-1198.

- Nielsen E. & Orcutt D.M., 1996. The physiology of plants under stress – abiotic stress. John and Sons, Inc, New York, 689p.
- Núñez M., Mazzafera P., Mazzora L.M., Siqueira W. J.& Zullo M. A. T. 2003/4. Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. Biol. Plant. 47(1): 67-70.
- 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.
- 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.
- O’Leary J. W. & Prisco J.T.P. 1970. Response of osmotically stressed plants to growth regulators. Adv. Front. Plant. Sci., 25:129-139.
- Oliveira, J. B. 2001. Pedologia Aplicada. Funep. Jaboticabal.
- Ozdemir F., Bor M., Demiral T. & Türkan I. 2004. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. Plant Growth Regul. 42: (3): 203-211.
- Perez-Alfocea F., Santa-Cruz A., Guerrier G., Bolarin M. C. 1994. NaCl stress-induced organic solute changes on leaves and calli of *Lycopersicon esculentum*, *L. pennellii* and their interspecific hybrid. J. Plant Physiol. 143:160-111.
- Perry C.A.; Tomos A.D.; Wyse R.E. & Hall J.L., 1987. The regulation of turgor pressure during sucrose mobilization and salt accumulation by excised root tissue of red beet. Planta 170: 353-361.

- Popova O.V., Dietz K. J. & Golldack D. 2003. Salt-dependent expression of a nitrate transporter and two amino acid transporter genes in *Mesembryanthemum crystallinum* Plant Mol. Biol. 52 (3): 569-578.
- Prisco J.T. 1980. Alguns aspectos da fisiologia do “stress” salino. Revta. Brasil. Bot. 3:85-94.
- Puiatti M.& Sodek L. 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. Plant Physiol. Biochem. 37: 767-773.
- Queiroz H.M. 2007. Efeito do sal no crescimento e metabolismo de plantas de *Glycine max* L. cultivar IAC 17. Tese de mestrado. Campinas.
- Rawat J.S. & Banerjee S.P. 1998. The influence of salinity on growth, biomass production and photosynthesis of *Eucaliptus camaldulensis* Dehnh. and *Dalbergia sissoo* Roxb. seedlings. Plant Soil 205: 163-169.
- Reddy M. P., & Vora A. B., 1986. Changes in pigment composition, Hill reaction activity and saccharides metabolism in Bajra leaves under NaCl salinity. Photosynthetica 20:50-55.
- 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.
- Reggiani R., Nebuloni M., Mattana M. & Brambilla I. 2000. Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. Amino Acids 18: 207-217.
- Rengasamy P. 2006. World salinization with emphasis on Australia. J. Exp. Bot. 57: 1017-1023.
- Righetti T. L., Vasconcelos C., Sandroch D.R., Ortega-Farias S., Moreno Y. & Meza F. J. 2007. Assesments CO<sub>2</sub> assimilation on per-leaf-area basis are related to total leaf area. J. Am. Soc. Hort. Sci. 132: 230-238.

- Rubinigg M., Posthumus F., Ferschke M., Theo J., Elzenga M. & Stulen I., 2003. Effects of NaCl salinity on  $^{15}\text{N}$ -nitrate fluxes and specific root length in the halophyte *Plantago maritima* L. Plant Soil 250:201-213.
- Salunkhe D. K., Chavan J. K. & Kadam S. S. 1986. Postharvest biotechnology of food legumes. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 23:103-141.
- Saíram R. K. 1994. Effect of homobrassinolide application on metabolic-activity and grain-yield of wheat under normal and water-stress condition. J. Agron. Crop Sci. 173:11-16.
- Santa-Maria G. E. Rubio F., Dubcovsky J. & Rodriguez-Navarro A. 1997. The HAK1 Gene of Barley Is a Member of a Large Gene Family and Encodes a High-Affinity Potassium Transporter. Plant Cell 12:2281-2289.
- Seeman J.R. & Critchley C., 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behavior and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. Planta 164: 151-162.
- Serraj R., Shelp B. J. & Sinclair T. R. 1998. Accumulation of gama-aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress. Physiol. Plant. 102:79-86.
- Serraj R., Sinclair T. R. & Purcell L. C. 1999. Symbiotic nitrogen fixation response to drought. J. Exp. Bot. 50: 143-155.
- Silveira J. A. G., Brito Cardoso B., Melo R. B. & Viegas R.D. 1999. Salt-induce decrease in nitrate uptake and assimilation in cowpea plants. Rev. Brasil. Fisiol. Veg. 11: 77-82.
- 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., Viegas R.D., Rocha I.M.A., Moreira A.C.D.M., Moreira R.D. & Oliveria J.T.A. 2003. Proline accumulation and glutamine synthase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *J Plant Physiol.* 160: 115-123.
- Singh A.K., RS Dubey R.S. 1995. Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystems 1 and 2 in rice seedlings. *Photosynthetica* 31: 489-499.
- Smart C.M. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126: 419-448.
- Souza C. A. F. & Sodek L. 2002. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *Braz. J. Plant Physiol.* 14:83-94.
- Subbarao G. V., Johansen C., Jana M. K. & Rao J. V. D. K. K. 1991. Comparative salinity responses among pigeonpea genotypes and their wild relatives. *Crop Sci.* 31: 415-418.
- Subbarao G .V.; Ito, O.; Berry, W.L. & Wheeler, R.M., 2003. Sodium – A Functional Plant Nutrient. *Crit.Rev. Plant Sci.* 22(5):391-416.
- Sultana N., Ikeda T., Itoh R. 1999. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environ. Exp. Bot* 42:211-220.
- Taiz L. & Zeiger, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. Terceira edição, Artmed, Porto Alegre, 705 p.
- Tester M. & Davenport, R., 2003. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503-527.
- Thomas A. L., Guerreiro S. M. C. & Sodek, L. 2005. Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root of system of nodulated soybean. *Ann. Bot.* 96: 1191-1198.
- Torrecillas A.; Alarcon J.J.; Sanchez-Blanco M.J. & Bolarin, M.C. 1994. Osmotic adjustment in leaves of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* in response to saline water irrigation.

- 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.
- Vardhini B. V. & Rao S. S. R. 1997. Effect of brassinosteroids on salinity induced growth inhibition of groundnut seedlings. *Indian J. Plant Physiol.* 2: 156-157.
- Vardhini B. V., Rao S. S. R. 1999. Effect of brassinosteroids on nodulation and nitrogenase activity of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Growth Regul.* 23:165-167.
- Volkmar K.M., Hu Y. & Steppurhn H., 1997. Physiological responses of plants to salinity: A review. *Can. J. Plant Sci.* 78:19-27.
- Wainright M. 1984. Sulfur oxidation in soils. *Advances in Agronomy*, San Diego, 37:349-396.
- Wei W.; Bilsborrow P.E., Hooley P., Fincham D. A., Lombi E. & Forster, B.P. 2003. Salinity induced differences in growth, ion distribution and partitioning in barley the cultivar Maythorpe and its derived mutant Golden Promise. *Plant Soil* 250: 183-191.
- 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 camaldulensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 82:189-200.
- Yazici I., Tuerkan I., Sekman A.H., Demiral T. 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleraceae* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Env. And Exp. Bot.* 61: 49-57.
- Yeo A., 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49:915-929.
- Zayed M. A. & Zeid I. M., 1997. Effect of water and salt stress on growth, chlorophyll, mineral ions and organic solutes contents, and enzymes activity in mung bean seedlings. *Bio. Plant.* 40(3):351-336.

Zhu J.-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66-71.

Zullo M. A. T. & Adam G. 2002. Brassinosteroid phytohormones-structure, bioactivity and applications. *Brazilian J. Plant Physiol.* 14: 143-181.