# Universidade Estadual de Campinas

Maria Cristina da Costa Ferreira

# Efeito do Sal no Crescimento e Metabolismo de *Vigna unguiculata* L. Walp *e Vigna luteola* (Jacq.) Benth.

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad

2005

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

F413e
Ferreira, Maria Cristina da Costa Efeito do sal no crescimento e metabolismo de *Vigna unguiculata* L. Walp e *Vigna luteola* (Jacq.) Benth / Maria Cristina da Costa Ferreira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.
Orientadora: Claudia Regina Baptista Haddad. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Salinidade. 2. Peroxidase. 3. Estresse oxidativo. 4. Plantas - Membrana celular. I. Haddad, Claudia Regina Baptista. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

Título em inglês: Salt effect in growth and metabolism of *Vigna unguiculata* L. Walp and *Vigna luteola* (Jacq.) Benth.

Palavras-chave em inglês: Salinity, Peroxidase, Oxidative stress, Plant – Cell membrane. Área de concentração: Biologia vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia vegetal.

Banca examinadora: Claudia Regina Baptista Haddad, Victor José Mendes Cardoso, Marlene Aparecida Schiavinato.

Data da defesa: 29/07/2005.

Universidade Estadual de Campinas

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

Maria Cristina da Costa Ferreira

# Efeito do Sal no Crescimento e Metabolismo de Vigna

unguiculata L. Walp e Vigna luteola (Jacq.) Benth.

aste exe	mplar corresponde à redação final
da tese	defendida pelo(a) candidato (a)
MARIA	CRISTINA DA COSTA FERREIRA
e aprova	da pela Comissão Julgadora.
	the date of

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad

Data da Defesa: 29/07/2005	
-	
BANCA EXAMINADORA	
Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Had	Idad Hadderd
Prof. Dr. Victor José Mendes Cardoso _	O. Seria
Profa. Dra. Marlene A. Schiavinato	machiavinet
Prof. Dr. Jorge Vega	

Data da Defesa: 29/07/2005		
Profa. Dra. Claudia Regina Haddad		
Prof. Dr. Victor José Mendes Cardoso		
Prof. Dra. Marlene A. Schiavinato		
Prof. Dr. Jorge Vega		

iii

"Mas buscai primeiro o seu reino e a sua justiça, e todas outras coisas vos serão acrescentadas" Mateus 6:33

#### Agradecimentos

Agradeço a Deus por permitir a realização deste sonho em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Carolina Marques da Costa Ferreira e Francisco da Cruz Ferreira pelo incentivo, apoio e investimento em minha vida pessoal e carreira profissional. A minha irmã pelo estímulo e auxílio para atingir mais esta etapa de minha vida. Ao meu namorado Ivan Carlos de Moraes Ferreira pelo amor e carinho dedicados a mim e por todos os momentos que esteve ao meu lado durante a realização deste projeto.

A Profa. Dra. Claudia R. B. Haddad que me ofereceu amizade, compreensão, carinho e investiu o seu melhor na minha carreira profissional.

Agradeço aos Prof. Dr. Jorge Vega, Prof. Dr. Victor José Mendes Cardoso e a Profa. Dra. Marlene A. Schiavinato pelas orientações durante o período de pré-banca e a Profa. Dra. Hildete Prisco Pinheiro, IMECC, Unicamp, pelo esclarecimento de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Jorge Vega que me auxiliou no desenvolvimento do projeto, ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek que tantas vezes tirou minhas dúvidas, a Profa. Dra. Marlene A. Schiavinato por auxiliar-me no projeto.

A Dulce, Dulcinéia, Denise, Paiola, Seu Domingos, Lúcia e Carlos que sempre me ajudaram na execução do meu projeto.

A Laura Becker, Luciana Benatti, Javier Pizón, Jorge Gouveia e Helena Queiroz que se tornaram grandes amigos e me deram suporte para realização do meu trabalho. Ao Milton que me salvou no dia do acidente. Aos demais colegas de curso, todos contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. A Luciana Uehara pelo auxílio e estímulo.

A Unicamp e a Capes que forneceram suporte físico e financeiro para a realização deste trabalho.

#### Resumo

O excesso de sais no solo afeta o metabolismo geral da planta, causando alterações fisiológicas e morfológicas. Visando avaliar os efeitos do sal no crescimento e metabolismo sob estresse salino, foram comparadas as respostas de *Vigna luteola* (halófita) e Vigna unguiculata (sensível). As plantas foram cultivadas na presença de NaCl nas concentrações de: 100mM, 250mM e 500mM.

*V. unguiculata* apresentou reduções significativas de massas fresca e seca, área foliar e número de folhas sob salinidade. Estes parâmetros não foram afetados em *V. luteola*.

Há dados na literatura que mostram que plantas adaptadas à salinidade apresentam a razão raiz/parte aérea maior que plantas sensíveis. Contudo, este aumento foi evidenciado na espécie mais sensível ao sal, sob salinidade, mantendo-se constante em *V. luteola*.

O aumento de suculência, que é considerado uma adaptação ao estresse salino, não foi verificado em nenhuma das espécies estudadas.

A resistência ao estresse salino tem sido relacionada com a atividade de enzimas antioxidantes, que removem espécies ativas de oxigênio. O aumento da atividade de peroxidases totais foi observado apenas em *V. luteola*, associado ao estresse salino.

Sob estresse salino, ocorreu o aumento da atividade de siringaldazina oxidase somente em *V. unguiculata*. Não foi observada relação entre crescimento de raízes e atividade desta enzima, pois nesta espécie a salinidade provocou maior crescimento da raiz.

A atividade de peroxidases totais em *Vigna luteola* está localizada na epiderme, córtex e cilindro central e, em *V. unguiculata* na epiderme e cilindro central. Sob estresse salino, a atividade foi mais intensa nas duas espécies. Em *V. luteola* foi observada em toda raiz, em *V. unguiculata*, além da epiderme e do cilindro central, foi possível observa-la em porções do

córtex.

A respeito da localização da enzima siringaldazina oxidase, em *V. unguiculata* restringiu-se à epiderme, expandindo - se para o córtex e cilindro central sob estresse salino. Já em *V. luteola* estava presente em todas as regiões da raiz, intensificando - se com a aplicação de NaCl no meio de cultivo.

A alteração da permeabilidade das membranas é um dos resultados da salinidade, que está relacionado ao aumento do teor de espécies ativas de oxigênio. Foi observado aumento de liberação de eletrólitos em ambas as espécies de *Vigna*. Entretanto, em *V. unguiculata*, o acréscimo neste parâmetro foi altamente significativo na presença de NaCl e com resultados sempre maiores aos mesmos tratamentos de *V. luteola*.

A manutenção da razão  $Na^+/K^+$  nas células é um fator relevante para a tolerância à salinidade. O acúmulo de  $Na^+$  foi observado em raízes e folhas das duas espécies de *Vigna*. Em raízes, obteve-se valores maiores em *V. luteola*, em decorrência a alta concentração de Na+ neste órgão. Em folhas, a maior razão  $Na^+/K^+$  foi obtida em *V. unguiculata*.

As análises de parâmetros bioquímicos sob estresse salino, indicaram que não houve variação no teor de proteínas (folhas), sacarose (folhas) e açúcares solúveis totais (raiz e folhas) em *Vigna luteola*.

Sob salinidade, o teor de proteínas foi reduzido em folhas de *V. unguiculata*. Já as concentrações de açúcares solúveis totais (raízes e folhas), sacarose (folhas) e malondialdeído (raiz) ficaram inalterados.

Mediante salinidade, não ocorreram alterações significativas nos parâmetros bioquímicos em *V. luteola*, o que permitiu seu crescimento e desenvolvimento normal.

As mudanças de indicadores bioquímicos e ausência de resposta antioxidante em *V*. *unguiculata* sob salinidade, podem estar relacionadas com o comprometimento do seu crescimento sob estresse salino.

#### Summary

The excess of salt in the soil affects all the general metabolism of the plant causing physiologic and morphologic alterations. With the objective of evaluating the effects of salt in the growth and metabolism under saline stress, this study compares the responses of two *Vigna* species, with distinct sensitivity to salt, cultivated with the presence of NaCl in the following concentrations: 100mM, 250mM e 500mM.

*V. unguiculata* presented significant reductions in fresh and dry mass, leaf area and number of leaves when subjected to salinity. However, these parameters were not affected in *V. luteola*.

There is data in the literature which shows that plants that have adapted to salinity present the root/shoot ratio higher than sensitive plants. On the other hand, this increase was evidenced in the species which is most sensitive to salt, under salinity, keeping itself constant in *V. luteola*.

The increase in juiciness, which is considered an adaptation to saline stress, was not present in either of the species studied.

The resistance to saline stress has been associated to the activity of antioxidant enzymes, which remove reactive oxygen species. The increase in activity of total peroxidases was observed only in *V. luteola*.

Under saline stress, only *V. unguiculata* presented an increase in siringaldazine oxidase activity. There was no evidence of relation between the growth of roots and the presence of this enzyme, since this species presented larger root growth due to salinity.

The histochemical location of total peroxidases activity indicated that the distribution of the activity of these enzymes is similar in both species of *Vigna* (epidermis, cortex and

central cylinder), however, there is stronger activity in V. luteola, especially under stress.

In relation to the location of the seringaldazine oxidase enzyme, in *V. unguiculata*t was restricted to the epidermis, expanding to the cortex and central cylinder under saline stress. In *V. luteola* it was present in all parts of the root, intensifying when NaCl was applied during cultivation.

The change in the membrane permeability is one of the results of salinity which is connected to the increase of reactive oxygen species concentration. An increase in eletrolites release was noticed in both *Vigna* species. Meanwhile, in *V. unguiculata*, the rise in this parameter was highly significative in the presence of NaCl and with results constantly higher than the results of the same treatments in *V. luteola*.

The maintenance of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio in the cells is a relevant factor to the tolerance of salinity. Na<sup>+</sup> accumulation was observed in both *Vigna* species' roots and leaves. In roots, higher values were obtained in *V. luteola*, due to the higher Na<sup>+</sup> concentration in this organ. In leaves, the highest Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio change was obtained in *V. unguiculata*.

The analysis of biochemical parameters under saline stress, show that there was no change in protein content (leaves), sucrose (leaves) and total soluble sugars (root and leaves) in *Vigna luteola*.

Protein content was reduced in *V. unguiculata* leaves, while concentrations of total soluble sugars (root and leaves), sucrose (leaves) e malondialdeid (root) remained the same.

Under salinity, there were no significant changes in the biochemical parameters of *V*. *luteola*, which allowed for its normal growth and development.

X

The changes in biochemical indicators and lack of antioxidant response in *V*. *unguiculata* under salinity may be connected to its growth and development compromise under saline stress.

# Índice

Resumo	vi
Summary	ix_
1.Introdução	01_
2. Objetivos	16
3. Material e Métodos	17
3.1 Material e Condições de Crescimento	17_
3.2 Efeito da Salinidade no Crescimento	18_
3.3 Efeito da Salinidade em Peroxidases	19
3.3.1 Determinação da Atividade de Peroxidases Totais e Siringaldazina	
Oxidase	19
3.3.2 Localização de Peroxidases Totais e Siringaldazina	
Oxidase	20
3.4 Efeito da Salinidade na Integridade da Membrana	
Plasmática	21
3.4.1 Determinação da Perda de Eletrólitos	21
3.5 Efeito da Salinidade nas Relações Iônicas	21
3.5.1 Determinação da Razão Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup>	21
3.6 Efeito da Salinidade em Parâmetros Bioquímicos	22
3.6.1 Dosagem de Proteínas Solúveis Totais	22
3.6.2 Dosagem de Açúcares	22
3.6.2.1 Extração de Açúcares	22
3.6.3 Dosagem de Açúcares Solúveis Totais	24
3.6.4 Dosagem de Sacarose	24
3.4.2 Dosagem de Malondialdeído	24
3.7 Delineamento Experimental e Análise Estatística	27
4. Resultados	29
4.1 Efeito da Salinidade no Crescimento	29
4.2 Efeito da Salinidade em Peroxidases	37
4.2.1 Determinação da Atividade Peroxidases Totais e Siringaldazina	
Oxidase	37
4.2.2 Localização de Peroxidases Genéricas e Siringaldazina	
Oxidase	39

4.3 Efeito da Salinidade na Integridade da Membrana Plasmática	
4.3.1 Determinação da Perda de Eletrólitos	42
4.4 Efeito da Salinidade nas Relações Iônicas	43
4.4.1 Determinação da Razão Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup>	43
4.5 Efeito da Salinidade em Parâmetros Bioquímicos	45
4.5.1 Dosagem de Proteínas Solúveis Totais	45
4.5.2 Dosagem de Açúcares Solúveis Totais	46
4.5.3 Dosagem de Sacarose	48
4.3.2 Dosagem de Malondialdeído	49
5. Discussão	50
6. Conclusões	59
7. Bibliografia	60

#### 1. Introdução

Os fatores ambientais que limitam a produtividade agrícola ou geram a perda de biomassa vegetal são denominados estresses ou distúrbios ambientais (Gaspar *et al.*, 2002; Ashraf & Harris, 2004). Segundo Levitt (1980), estresse é um fator externo desfavorável à sobrevivência de um organismo. Sob a perspectiva da fisiologia, o estresse é uma condição causada por um ou mais fatores, que tendem a alterar o equilíbrio de um organismo. Os agentes indutores de estresse ou estressores podem ser de origem biótica como: herbivoria, doenças (bactérias, fungos e vírus), ou de origem abiótica: fatores físicos (seca, temperatura, radiação, alagamento, vento) e químicos (poluição do ar, metais pesados, pesticidas, toxinas, pH do solo, salinidade) (Nilsen & Orcutt, 1996). Contudo, Souza e Cardoso (2001) propuseram um novo critério para definir o conceito estresse, levando em consideração a sensibilidade do organismo ao agente estressor. Segundo estes autores, a definição de estresse mais adequada é: "uma resposta integrada da organização hierárquica, estrutural e funcional, da planta a qualquer distúrbio ambiental, de modo que sua estabilidade seja significativamente alterada, comprometendo sua reprodução e/ou encurtando seu ciclo natural de vida".

No solo, o excesso de sais solúveis altera desfavoravelmente a produtividade das plantas (Allison *et al.*, 1985). A concentração elevada de sais pode ser causada por inúmeros fatores, como práticas inadequadas de irrigação, que conduzem freqüentemente ao acúmulo de altas concentrações de carbonatos de cálcio e magnésio (Flowers & Yeo, 1995; Tester & Davenport, 2003), inundação do solo pela água do mar em regiões costeiras (Haddad & Mazzafera, 1999), depósito de altas concentrações de NaCl em regiões com recente história geológica marinha (Tester & Davenport, 2003) e intemperismo químico (Oliveira, 2001).

O termo salino aplica-se a solos cuja condutância elétrica é maior que 4mmhos/cm<sup>2</sup> a 25°C (Allison *et al.*, 1985). Os sais ocorrem como cristais no solo, na solução do solo ou do lençol freático (Buring, 1970 citado por Oliveira, 2001).

Cerca de 45 dos 230 milhões de hectares da área irrigada do globo terrestre apresentam-se afetados pela salinização, principalmente nas regiões áridas e semi-áridas, onde 25% das áreas já se encontram salinizadas (FAO, 2000).

No Brasil, os solos salinos ocorrem em relevos planos de várzeas e esporadicamente em terraços, principalmente nas regiões semi-áridas nordestinas, pantanal matogrossense e áreas litorâneas relacionadas com a vegetação de mangue (Oliveira, 2001).

As plantas são classificadas de acordo com a habilidade de crescer em ambientes salinos como halófitas ou glicófitas. Halófita significa literalmente plantas de sal (Levitt, 1980). Segundo Flowers *et al.* (1977), as halófitas são plantas que sobrevivem e completam seu ciclo de vida sob alta salinidade (concentração mínima de 300mM de NaCl). Em adição, Hasegawa *et al.* (2000) definem as halófitas como plantas que necessitam de altas concentrações de eletrólitos (tipicamente Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) ou níveis salinos acima daqueles encontrados em solos não salinos, variando entre 20 a 500mM de NaCl, para um ótimo crescimento.

Glicófitas são plantas que não crescem na presença de altas concentrações de sal. Solos com cerca de 0,3% a 0,5% de sais inibem o crescimento das espécies deste grupo (Levitt, 1980). A maioria das plantas cultivadas encontra-se neste grupo (Greenway & Munns, 1980).

Segundo Subbarao *et al.* (2003), o íon sódio (Na<sup>+</sup>) é considerado um elemento funcional (a ausência do nutriente pode interromper funções do metabolismo inibindo o crescimento vegetal) e vital para plantas com metabolismo C<sub>4</sub>. O Na<sup>+</sup> desempenha importante papel na assimilação de carbono, através de sua atuação na regeneração do fosfoenolpiruvato

(PEP) e absorção de nitrato (Ohta *et al.*, 1989; Subbarao *et al.*, 2003). Além destas atribuições, este íon pode desempenhar algumas funções conferidas ao íon potássio, como manutenção do turgor celular (Flowers & Läuchli, 1983) e controle da abertura estomática (Subbarao et al., 2003).

O íon cloro (Cl<sup>-</sup>) é um micronutriente para plantas. É o principal ânion com atividade osmótica no vacúolo, estando envolvido com a manutenção do turgor e osmorregulação. Também está vinculado ao fluxo iônico de membranas estabilizando seu potencial, regulando o gradiente de pH e excitabilidade elétrica (White & Broadley, 2001).

O movimento do sal dentro das plantas, a partir das raízes para a parte aérea está associado à transpiração (Yeo, 1998).

O íon Na<sup>+</sup> geralmente move-se passivamente para dentro das células (Tester & Davenport, 2003). Com o influxo de Na<sup>+</sup>, o potencial de membrana dissipa-se, facilitando a entrada de Cl<sup>-</sup>, reduzindo o gradiente químico (Hasegawa *et al.*, 2000). O Na<sup>+</sup> também pode entrar nas células por intermédio de carregadores de baixa afinidade e alta afinidade, comuns ao K<sup>+</sup> (Hasegawa *et al.*, 2000; Apse & Blumwald, 2002).

A tolerância ao sal usualmente é associada à habilidade da planta em restringir a absorção e/ou transporte de íons da raiz para parte aérea (Hajibagheri *et al.*, 1987, O'Leary, 1995; Wei *et al.*, 2003).

A planta pode utilizar os seguintes mecanismos para minimizar os danos causados pela salinidade: (1) minimizar a entrada inicial de Na<sup>+</sup> nas células e maximizar o seu efluxo; (2) minimizar a condução deste íon para parte aérea; (3) elevar ao máximo a recirculação de Na<sup>+</sup> via floema; (4) compartimentar o Na<sup>+</sup> ou direcioná-lo para partes velhas da planta (como folhas) e, (5) secretar os sais em alta concentração (Tester & Davenport, 2003). Grandes quantidades de Na<sup>+</sup> podem ser acumuladas em vacúolos pela ação de carregadores antiportes

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> no tonoplasto (Ashraf, 2002), os quais, sob estresse salino têm sua atividade rapidamente aumentada em plantas resistentes (Andreev, 2001).

A membrana plasmática das células das raízes é o principal sítio de interação com ambiente salino (Borochov-Neori & Borochov, 1991). Kurban *et al.* (1998), sugeriram que a tolerância ao estresse salino pode estar relacionada à menor permeabilidade da membrana celular. De acordo com Suhayda *et al.* (1992), em espécies mais resistentes ao sal, o íon Na+ fica concentrado nas raízes. Mudanças na membrana plasmática quanto à sua composição e/ou estrutura podem afetar sua permeabilidade e/ou fluidez, afetando atividade de transportadores, que devem refletir no crescimento da planta (Racagni *et al.*, 2003/4).

As alterações na membrana podem ocorrer devido ao contato com o íon Na<sup>+</sup> que causa despolarização na membrana, as quais podem conduzir à interrupção dos mecanismos de absorção iônica e seletividade (Greenway & Munns, 1980; Cramer *et al.*, 1985). De acordo com Mansour *et al.* (1993) e Mansour (1995), o componente osmótico do estresse salino, ou seja, a menor disponibilidade de água para a planta, não confere danos à membrana plasmática. Os efeitos deletérios da salinidade referem-se essencialmente à ação dos efeitos tóxicos dos íons.

Segundo Shinitzky & Henkart (1978), a fluidez de membranas é regulada por sua composição química, principalmente por sua razão lipídios/proteínas. A permeabilidade depende das alterações da composição e estrutura da membrana (Mansour & Salama, 2004). Alguns autores observaram que sob estresse salino ocorreram alterações na composição lipídica de membrana celular em soja (Zenoff *et al.*, 1994) e *Vigna unguiculata* (Vazquezduhalt *et al.*, 1991). Recentemente, Mansour & Salama (2004), afirmaram que a mudança de permeabilidade da membrana plasmática é decorrência da alteração lipídica,

como por exemplo, o aumento de esteróis e do grau de saturação dos ácidos graxos da membrana.

Contudo, Borochov-Neori & Borochov (1991) utilizando plantas de melão, cultivadas em hidroponia, relataram o aumento do conteúdo protéico na membrana, reduzindo a razão lipídios/proteínas com a crescente concentração salina no meio de cultivo (0-125mM de NaCl). Estes autores inferiram que a inclusão protéica na membrana gerou uma bicamada mais rígida, reduzindo assim a sua fluidez.

Sob estresse, as modificações das membranas podem ser evidenciadas através da liberação de solutos. Borochov-Neori & Borochov (1991) observaram, em raízes de plântulas de melão, que a liberação de eletrólitos sob tratamento salino foi mais rápida e com maior em magnitude em comparação ao controle, indicando alteração nas propriedades das membranas. Uma das causas do aumento da liberação de eletrólitos é a peroxidação de membranas, causada por espécies ativas de oxigênio (Alonso *et al.*, 1997; Queiroz *et al.*, 2002).

As espécies reativas de oxigênio, como superóxido  $(O_2 \cdot)$ , peróxido de hidrogênio  $(H_2O_2)$  e radical hidroxila (·OH), são produzidas constantemente como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (Foyer & Harbison, 1994 citado por Apel & Hirt, 2004; den Camp *et al.*, 2003). Estas moléculas também são produzidas por reações catalisadas por várias oxidases e peroxidases em respostas a fatores ambientais adversos (Apel & Hirt, 2004), dentre os quais o estresse salino (Parida *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2004).

A mitocôndria e os cloroplastos são os principais geradores intracelulares de espécies ativas de oxigênio (Meloni *et al.*, 2003). O equilíbrio entre a produção e a remoção destas moléculas, pode ser perturbado por fatores ambientais adversos (den Camp *et al.*, 2003). Como resultado deste distúrbio, o nível intracelular de espécies ativas de oxigênio pode

aumentar rapidamente (Smirnoff, 1993; Lawlor, 1995 citado por Queiroz *et al.*, 2002; Elstener, 1991 citado por den Camp *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

As espécies ativas de oxigênio causam danos a proteínas, ácidos nucléicos, carboidratos e lipídios (Monk *et al.*, 1989). A decomposição dos lipídios polinsaturados de biomembranas, causada pela exposição a condições ambientais adversas, é mediada pela ação peroxidativa, que gera uma gama de subprodutos carbonil, sendo um deles o malondialdeído, que tem o acúmulo elevado sob estresse salino (Kennedy & Filippis, 1999) e pode ser um bom indicador de formação de radicais livres no tecido avaliado (Parida *et al.*, 2004). As espécies ativas de oxigênio também podem influenciar na expressão gênica e ser sinalizadoras na via de transdução de sinais (den Camp *et al.*, 2003).

Mecanismos de defesa antioxidante podem ser uma estratégia para aumentar a tolerância ao estresse salino (Hernández *et al.*, 2001). As plantas dispõem de processos enzimáticos e não enzimáticos para remover as espécies ativas de oxigênio (Vaidyanathan *et al.*, 2003).

As metaloenzimas superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) convertem  $O_2$  a  $H_2O_2$ . Catalases (EC 1.11.1.6) e peroxidases são as principais enzimas de detoxificação de  $H_2O_2$  em plantas. Aparentemente as catalases estão ausentes nos cloroplastos, dessa forma a detoxificação da  $H_2O_2$  nesta organela é realizada pelo ciclo ascorbato-glutationa (Asada, 1992) numa reação catalisada pela enzima ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) (Chen & Asada, 1989).

O aumento da atividade de peroxidases sob estresse salino foi observado em diversos trabalhos (Peyrano *et al.*, 1997; Lin & Kao, 2001; Mittova *et al.*, 2002; Meloni *et al.*, 2003; Parida *et al.*, 2004) e associado com a tolerância sob alta salinidade, por constituir uma forma

de proteção contra os danos oxidativos, podendo ser utilizado como marcador de estresse salino (Parida *et al.*, 2004).

Sabe-se há mais de um século que a salinidade inibe o crescimento vegetal, reduz a produção e acelera a senescência de muitas plantas (Flowers *et al.*, 1977; Helmy *et al.*, 1994; Lutts *et al.*, 1996; Munns *et al.*, 1995; O'Leary & Prisco, 1970; Prisco, 1980; Sharma, 1996).

As concentrações de sais que restringem o crescimento das plantas variam amplamente e estão relacionadas com: (1) espécie, variedade ou órgão investigados; (2) estágio de desenvolvimento vegetal; (3) grau de estresse imposto (suave, médio ou severo); (4) tipo de sal; (5) tempo de exposição ao agente estressor e (6) concentração de potássio e cálcio no meio em que está a raiz (Shannon, 1992; Neumann, 1997).

Mesmo espécies consideradas tolerantes ao sal, apresentam redução do crescimento em presença de salinidade, embora em igual concentração de sal, plantas tolerantes sejam capazes de manter taxas maiores de crescimento em relação às sensíveis (Neumann, 1997).

Munns e Termaat (1986), avaliaram o crescimento de cevada, trigo, duas variedade de algodão e tremoço sob estresse salino e sugeriram que a inibição do crescimento está relacionada com a taxa de expansão foliar. Em curtos períodos de exposição ao estresse salino (horas ou dias), a inibição do crescimento é mediada por respostas da raiz à queda do potencial hídrico do solo. Segundo estes autores, esta reação seria comunicada à parte aérea através de reguladores de crescimento, provocando o declínio da expansão foliar. Em longos períodos (semanas ou meses), a expansão foliar dependeria da habilidade da planta em evitar a concentração excessiva de íons nos tecidos, e produzir novas folhas numa taxa maior que a perda das folhas velhas.

A queda do potencial hídrico externo está associada ao aumento da pressão osmótica da solução do solo (Szabolcs, 1994) e ao gradiente de concentração de Na<sup>+</sup> no apoplasto foliar desde que este íon penetre na folha, via xilema (Tester & Davenport, 2003).

Sabe-se que o crescimento foliar depende, basicamente, da divisão e/ou aumento das suas células. Estes dois fenômenos, por sua vez, dependem do metabolismo e, especialmente, do balanço hídrico das células da folha (Prisco, 1980). Uma conseqüência da combinação da alta salinidade e imposição do estresse hídrico é a redução da taxa de crescimento foliar, que pode representar uma resposta adaptativa. Este é um efeito precoce da inibição de crescimento, e pode prolongar a sobrevivência da planta, pois limita a perda de água pela transpiração e otimiza o uso da reserva limitada de água do solo (Richards, 1993 citado por Neumann, 1997). Outra adaptação à salinidade é a suculência onde há aumento da espessura foliar, que visa evitar o déficit hídrico por aprimorar o uso da água de maneira eficiente (Greenway & Munns, 1980) e reduzir a concentração de sais no protoplasma (Larcher, 2000).

A redução no número de folhas foi observada em *D. sissoo* (Rawat & Banerjee, 1998), *V. vexillata* (Okusanya & Oyesiku, 1994), beterraba (Ghoulam *et al.*, 2002) e em *Cakile maritima* (Debez *et al.*, 2004).

A salinidade afeta a massa foliar específica (massa seca/área foliar). Na presença de sal, este parâmetro aumentou em soja (Wang *et al.*, 2002). Da mesma maneira, vários trabalhos mostram que a área foliar específica (a recíproca da massa foliar específica), diminui sob estresse salino em feijão (Bray & Reid, 2002; Bayuelo-Jimenez *et al.*, 2003), pepino (Chen *et al.*, 1999) e em *Artemisia* sp. (Ishikawa & Kachi, 2000).

O maior crescimento da raiz em relação ao caule tem sido considerado uma adaptação morfológica ao estresse hídrico e salino (Creelman *et al.*, 1990, Saab *et al.*, 1990),

apresentando como benefício o aumento da área de absorção de água e nutrientes, prevenindo deficiência mineral e desidratação (Okusanya, 1977).

A toxicidade metabólica do Na<sup>+</sup> é resultado da habilidade deste íon em competir com o íon K<sup>+</sup> na absorção e nas ligações em sítios de funções celulares essenciais (Grattan & Grieve, 1999; Subbarao *et al.*, 2003; Tester e Davenport, 2003). O K<sup>+</sup> é essencial em toda a vida da planta, pois está envolvido no balanço de cargas no citoplasma, contrabalançando as cargas negativas de proteínas e ácidos nucléicos. É ativador de reações enzimáticas vitais, contribui significativamente para a manutenção do potencial osmótico do vacúolo e turgor celular e é essencial na síntese de proteínas (Maathuis & Amtmann, 1999; Tester e Davenport, 2003). Diversos autores concordam que uma alta razão K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> no citoplasma é um fator determinante na manutenção da tolerância da planta à salinidade (Maathuis & Amtmann, 1999; Volkmar *et al.*, 1998). Maathuis & Amtmann (1999) atribuem um valor mínimo de aproximadamente 1,0 para esta razão, em células vegetais.

A inibição do crescimento da raiz pela salinidade pode afetar a área total e o volume de solo que pode ser explorado (Neumann *et al.*, 1994), prejudicando a absorção de nutrientes (Greenway & Munns, 1980).

Vários autores têm observado o enrijecimento das paredes celulares na raiz sob estresse salino, o que pode causar a redução no crescimento radicular (Cachorro *et al.*, 1993; Neumann *et al.*, 1994).

Lin e Kao (1999, 2001) demonstraram recentemente que o enrijecimento da parede celular está associado ao aumento do teor de  $H_2O_2$  e à atividade de peroxidases da parede celular.

Sancho *et al.* (1996) demonstraram que a presença de NaCl no meio de cultura de células de tomateiro elevou a concentração de compostos semelhantes a ligninas nas paredes

celulares. De maneira semelhante, em raiz de feijoeiro, o estresse salino gerou adiantamento e acréscimo na lignificação dos tecidos vasculares (Cachorro *et al.*, 1993).

A lignina é um composto fenólico heteropolimérico. É o segundo polímero mais abundante depois da celulose e representa cerca de 30% da biomassa vegetal (Boudet *et al.*, 1995; Boudet, 2000). Tem a função de impermeabilizar as paredes celulares primárias das células da endoderme e exoderme, promovendo rigidez mecânica e possibilitando o controle da absorção e perda de água e solutos nas raízes (Steudle & Peterson, 1998; Steudle, 2000; Hose *et al.*, 2001; Grassi, 2002).

A lignina é constituída de radicais (monômeros) produzidos através da oxidação de monolignóis (Boudet, 2000). Estes monômeros são moléculas de álcool hidroxicinâmico com diferentes graus de metoxilação, originados da via metabólica de fenilalanina. Os principais monolignóis que formam a lignina são: álcool p-coumaril, álcool coniferil e álcool sinapil (Boerjan *et al.*, 2003).

Até recentemente, era consenso que somente as peroxidases participavam da via de biossíntese da lignina. Contudo, estão surgindo evidências de que lacases e outras oxidases também estão envolvidas neste processo (Boudet, 2000).

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) são enzimas com grupo heme, presentes em animais, vegetais e em microorganismos. Elas catalisam a oxidação de substratos celulares com gasto de  $H_2O_2$  ou hidroperoxidos orgânicos (Asada, 1992; Hiraga *et al.*, 2001; Ros Barceló *et al.*,2003):

$$AH_2 + H_2O_2 (ROOH) \rightarrow A + 2 H_2O (ROH + H_2O)$$

A maior parte das peroxidases cataliza a oxidação de um doador de elétrons (AH<sub>2</sub>) utilizando peróxido de hidrogênio, formando uma reação de duas fases:

$$2 \operatorname{AH}_2 + \operatorname{H}_2\operatorname{O}_2 \rightarrow 2\operatorname{AH}^{\bullet} + 2 \operatorname{H}_2\operatorname{O}$$

$$2AH \cdot \rightarrow AH_2 + A$$

As peroxidases presentes em eucariontes e procariontes são divididas em três superfamílias, com base na sua estrutura e propriedades catalíticas (Hiraga *et al.*, 2001). Dentro da terceira superfamília, estão contidas as peroxidases vegetais (Ros Barceló *et al.*, 2003).

A Classe I é constituída de enzimas intracelulares em plantas, bactérias e leveduras como citrocromo c peroxidase (E.C. 1.11.1.5) e ascorbarto peroxidase (E.C. 1.11.1.11) de cloroplasto e citossol (Ros Barceló *et al.*, 2003). A Classe II é formada de enzimas extracelulares de fungos (Hiraga *et al.*, 2001; Ros Barceló *et al.*, 2003).

A Classe III é constituída por enzimas que são secretadas no apoplasto (Ros Barceló *et al.*, 2003). Na Classe III, as enzimas são encontradas estritamente em vegetais. Estas enzimas apresentam alta estabilidade térmica, têm natureza glicoproteíca e estão presentes na parede celular ou vacúolo. (Ros Barceló *et al.*, 2003). As peroxidases localizadas no apoplasto formam ligações iônicas ou covalentes com polímeros da parede celular (Minibaeva & Gordon, 2003).

As peroxidases apresentam uma ampla variedade de substratos específicos, embora apresentem um grau evidente de afinidade pelo substrato álcool coniferil (Ros Barceló *et al.*, 2003). As peroxidases comumente reagem com compostos que contêm grupo(s) hidroxila ligado(s) a anéis aromáticos. Usualmente utiliza-se o substrato guaiacol (*o*-metoxi fenol) para avaliar a atividade de peroxidases (Hiraga *et al.*, 2001).

As peroxidases participam de inúmeros processos fisiológicos como lignificação, suberização, catabolismo de auxinas, tolerância à salinidade, senescência, mecanismos de defesa contra patógenos e herbivoria (Asada, 1992; Boudet *et al.*, 1995; Hiraga *et al.*, 2001; Kawano, 2003).

Catesson (1978 citado por Goldberg *et al.*, 1983) demonstrou que peroxidases da parede apresentavam uma afinidade especial pelo substrato siringaldazina, até então utilizado em testes histoquímicos. Estudos posteriores sugeriram que a atividade da siringaldazina oxidase estava relacionada ao processo de lignificação dos tecidos (Fleuriet & Deloiré, 1982 citado por Goldberg *et al.*, 1983). Goldberg *et al.* (1983) caracterizaram a siringaldazina oxidase, confirmando o seu envolvimento com o processo de lignificação.

A siringaldazina oxidase tem alta atividade na parede celular, contudo também está presente no citoplasma com atividade quase nula. É altamente estável sob altas temperaturas (até 70°C) e apresenta uma afinidade 100 a 1000 vezes maior pelo substrato siringaldazina (que tem estrutura semelhante aos precursores de lignina) do que pelo guaiacol (Goldberg *et al.*, 1983). Peyrano *et al.* (1997) sugeriram que a siringaldazina oxidase também pode estar envolvida com a síntese de suberina.

Açúcares têm importante papel no metabolismo de plantas sob salinidade (Hasegawa *et al.*, 2000). O acúmulo de açúcares é útil como fonte de energia necessária para o metabolismo de células mais ativas (Elavumoottil *et al.*, 2003). Contudo, a principal conseqüência da escassez de K<sup>+</sup> é a redução do ganho de carbono, implicando na queda do estoque de carboidratos não estruturais nas folhas (Ericsson, 1995), já que os estômatos não funcionam de maneira adequada. A redução no suprimento de dióxido de carbono pode diminuir a alocação de biomassa para a região da raiz da planta (Brouwer, 1962; Thornley, 1972; Dewar, 1993 citados por Ericsson, 1995).

Sob estresse salino há redução no conteúdo de proteínas, pois a síntese protéica é prejudicada e há aumento na proteólise (Evers *et al.*, 1997; Silveira *et al.*, 2003). Embora a

síntese protéica seja prejudicada, existem proteínas que são acumuladas e constituem um estoque de nitrogênio que pode ser utilizado pelo vegetal após o término da condição adversa gerada pelo sal (Ashraf & Harris, 2004).

As plantas necessitam sustentar um potencial hídrico interno menor que o do solo para conservar seu turgor e absorção de água para o crescimento; para tanto, precisam manter uma alta concentração osmótica em suas células, o que é atingido através da absorção de solutos iônicos do solo e/ou da síntese de solutos compatíveis. Este fenômeno é chamado de ajustamento osmótico (Prisco, 1980; Tester & Davenport, 2003).

Os solutos inorgânicos são compartimentados nos vacúolos das células vegetais (Flowers & Läuchli, 1983). O custo metabólico do ajustamento osmótico por íons inorgânicos é baixo, embora a alta concentração destes íons na célula gere interferência nas atividades metabólicas celulares (Polyjakoff-Mayber, 1975 citado por Volkmar *et al.*, 1998).

Solutos compatíveis são definidos como osmólitos orgânicos responsáveis pelo balanço osmótico e ao mesmo tempo são compatíveis com o metabolismo celular (Yeo, 1998). Estes solutos orgânicos de baixo peso molecular ficam alojados no citossol, lúmen, matriz ou estroma de organelas (Rhodes & Samaras, 1994 citado por Hasegawa *et al.*, 2000; Yeo, 1998). Tipicamente, as vias de síntese destes compostos são conectadas ao metabolismo básico e as moléculas que necessitam de via biossintética adicionais, têm estas vias acionadas pela condição de estresse. Contudo, o custo metabólico para produção destas moléculas é alto, pois consome uma quantidade de carbono significativa, que poderia ser utilizada para o crescimento (Greenway & Munns, 1980). Neste agrupamento estão incluídos açúcares (trealose, sacarose), proteínas solúveis (LEA, osmotina, deidrinas), aminoácidos e aminas, compostos quaternários de amônia (glicina-betaína, prolina-betaína) e polióis (manitol, sorbitol) (Volkmar, 1998; Yeo, 1998; Asharaf & Harris, 2004). De acordo com Cram (1976), entre os vários solutos orgânicos, os açúcares contribuem com 50% ou mais do potencial osmótico total em glicófitas em condições salinas. De acordo com Perry *et al.* (1987), a sacarose é um dos açúcares mais importantes envolvidos com o turgor celular.

Outras funções associadas aos solutos compatíveis são: (1) estabilizar proteínas e membranas celulares (trealose), pois tipicamente estes solutos são hidrofílicos, o que sugere que possam substituir a água na superfície destas moléculas (Greenway & Munns, 1980; Bohnert & Shen, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000). De acordo com Rudolph *et al.* (1986), os açúcares formam pontes de hidrogênio com grupos polares de fosfolipídios, o que pode proporcionar a preservação das membranas em condições de dessecação (Crowe *et al.*, 1984 citado por Rudolph *et al.*, 1986); (2) proteger contra espécies ativas de oxigênio (Greenway & Munns, 1980; Bohnert & Shen, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000).

A família Leguminosae possui cerca de 17.500 espécies, constituindo-se em uma das mais numerosas dentre as dicotiledôneas. Sua distribuição estende-se por todo o mundo, em particular em regiões tropicais e subtropicais. Fornecem uma enorme quantidade de recursos com uma grande aplicabilidade prática, que compreendem desde plantas agrícolas usadas tanto na alimentação humana quanto animal e, ainda usadas para a nitrogenação dos solos, até aquelas que fornecem matérias-primas para indústrias química, farmacêutica e madeireira (Moreira, 1997).

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

O gênero *Vigna* ocorre nas regiões tropicais e subtropicais com uma ampla distribuição mundial (Souza e Silva & Freire Filho, 1998).

*Vigna unguiculata* L. Walp., sinônimo de *Vigna sinensis* (L.) Savi ex Hassk, é uma erva originária da África (Moreira, 1997). Apresenta porte ereto a prostrado, flores púrpuras a brancas, ciclo curto, alta rusticidade e adaptabilidade às condições de estiagem prolongada e capacidade de se desenvolver em solo de baixa fertilidade (Oliveira & Carvalho, 1988; Andrade Júnior *et al.*, 2003). Conhecida como feijão-de-corda, feijão-caupi ou feijão-macassar é uma cultura de destaque na economia do Nordeste e Norte do Brasil, sertão semi-árido e em pequenas áreas da Amazônia, respectivamente (Teixeira *et al.*,1988). O caupi é cultivado para produção de grãos secos, grãos verdes e vagens para alimentação humana, bem como para

Dentre as variedades da espécie *V. unguiculata*, encontra-se a denominada Vita 5, a qual foi introduzida pela Embrapa. Esta variedade é considerada sensível ao estresse hídrico por Guimarães (1988, citado por Fernandes de Melo *et al.*,1994) e ao estresse salino (Fernandes de Melo *et al.*, 1989; Jolivet *et al.*, 1990); embora Costa *et al.* (2003) tenham verificado recentemente que esta variedade apresenta boa resistência ao estresse salino, em meio hidropônico com concentrações de até 75mM de NaCl.

*Vigna luteola* (Jacq.) Benth. é uma erva amplamente difundida na África e América tropical, nativa do Brasil, encontrada com freqüência em beira de praias, restingas e margens de cursos d'água (Moreira, 1997; Okusanya & Oyesiku, 1994). Okusanya & Oyesiku, (1994) classificaram esta espécie como halófita, já que suas plantas cresceram em presença de sal (até 70% da concentração da água do mar), apresentando aumento geral da massa seca. Apresentou também aumento do crescimento relativo das raízes, sob salinidade, o que foi relacionado a uma maior capacidade de captação de água e nutrientes, prevenindo deficiência mineral e desidratação.

# 2. Objetivos

Investigar os fatores que podem estar relacionados com a tolerância à salinidade em *Vigna unguiculata* L. Walp cultivar Vita 5 (sensível ao sal) e *Vigna luteola* (Jacq.) Benth. (espécie tolerante ao sal).

### **Objetivos Específicos**

- 1. Analisar e comparar, sob estresse salino:
- Medidas de crescimento.
- A atividade e localização de peroxidases.
- Indicadores bioquímicos que podem estar relacionados com a tolerância ao estresse

salino.

• Danos oxidativos em membranas.

2. Relacionar os indicadores bioquímicos e danos oxidativos ao crescimento das espécies.

#### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Material e Condições de Cultivo

O efeito da salinidade foi avaliado nas leguminosas *Vigna luteola* (Jacq.) Benth e *Vigna unguiculata* L. Walp.

Foram obtidas sementes de *Vigna luteola* (Jacq.) Benth a partir de mudas provenientes da região litorânea do Estado de São Paulo, que foram cultivadas na área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal – IB – Unicamp. Sementes de *Vigna unguiculata* L. Walp, cv. Vita 5, foram cedidas pela Embrapa Nordeste.

As sementes foram esterilizadas com hipoclorito de sódio a 2,5%. Além disso, as sementes de *Vigna luteola* foram escarificadas mecanicamente. As sementes das duas espécies foram depositas em bandejas plásticas contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada e mantidas dentro de germinador sob luz constante e temperatura alternando a cada 12 horas entre 30 °C e 25 °C, até a germinação.

Cinco dias após a germinação, as plantas jovens foram transferidas para casa de vegetação e transplantadas em copos plásticos brancos de 700mL, ou em vasos de 2,5L, contendo vermiculita pré-lavada. Foram cultivadas sob tela sombrite, durante três dias, sendo então transferidas para bancadas, sob luz natural. Sete dias após o transplante, as plantas começaram a receber solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1938).

Com base na concentração da água do mar de cerca de 599mM (Mc Inteyre, 1982, citado por Haddad e Mazzafera, 1999), foram estabelecidas as concentrações de NaCl utilizadas nos testes realizados. Os experimentos foram instalados utilizando-se quatro tratamentos distintos, com diferentes concentrações de NaCl: controle (sem adição de NaCl), 100mM, 250mM e 500mM de NaCl, utilizados nos ensaios de crescimento, avaliação de parâmetros bioquímicos, integridade de membrana e peroxidases. As concentrações de

250mM e 500mM foram utilizadas no ensaio de relações iônicas. O cloreto de sódio foi adicionado à solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1938). A partir de 30 dias após o transplante, cada copo recebeu 150mL e cada vaso 300mL de solução nutritiva, acrescida ou não de NaCl, como se segue: 1° dia – 50mM, 2° dia - sem aplicação, 3° dia – 100mM, 4° dia – sem aplicação, 5° dia – 100mM e 200mM, 6° dia – sem aplicação, 7° - 100mM, 250mM e 300mM, 8° dia – sem aplicação, 9° - 100mM, 250mM e 400mM, 10° dia – sem aplicação, 11° - 100mM, 250mM e 500mM, 12° dia – sem aplicação, 13° - 100mM, 250mM e 500mM, 14° - coleta. A aplicação da solução contendo NaCl foi realizada com concentrações crescentes do soluto, com o objetivo de favorecer o ajustamento osmótico, evitando a desidratação da planta, devido ao abaixamento abrupto do potencial hídrico do solo e perda de água das células da raiz para o mesmo (Prisco, 1980). Entre as aplicações, os vasos foram lavados com 300mL de solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1938) para evitar o acúmulo de NaCl no substrato e, em seguida esperou-se o escoamento total da solução por cerca de 12hs, para evitar a diluição posterior da solução salina.

Os ensaios foram desenvolvidos no período de fevereiro a março/2004, com temperatura variando de 17 a 35°C, e no período de setembro a novembro/2004, com temperatura de 17 a 39°C.

#### 3.2 Efeito da Salinidade no Crescimento

As plantas foram analisadas quanto a massas fresca e seca de raiz, caule e folhas. A massa seca foi determinada após as amostras permanecerem 72hs em estufa a 80°C. A massa seca livre de cinzas foi avaliada, já que em plantas cultivadas em presença de sal, o acúmulo iônico pode representar uma parcela importante do valor atribuído à massa seca. Este resultado foi alcançado a partir da dedução entre o valor da massa de amostras secas a 80°C, e da massa

de cinzas. Para a obtenção das cinzas as amostras foram mantidas em mufla a 550°C durante 8hs.

Avaliou-se os comprimento da raiz e da parte aérea, o número de folhas e a área foliar. A área foliar foi obtida com medidor modelo L1-3110, Licor.

Foram determinadas as razões comprimento raiz/ comprimento parte aérea e massa seca raiz/massa seca parte aérea. O teor de suculência foliar (massa de água/área foliar) também foi avaliado. A massa de água foi obtida pela diferença entre massa fresca e massa seca. A massa foliar específica foi calculada pela razão massa seca de folhas/área foliar.

#### 3.3 Efeito da Salinidade em Peroxidases

#### 3.3.1 Determinação da Atividade de Peroxidases Totais e Siringaldazina Oxidase

A atividade de peroxidases totais e siringaldazina oxidase em raízes foi determinada a partir de método cinético descrito por Peyrano *et al.* (1997), com modificações.

As raízes foram maceradas com nitrogênio líquido em almofariz congelado. Adicionou-se tampão de extração fosfato de sódio monobásico a 10mM e pH 6, na proporção de 10mL para cada grama de amostra. Os extratos foram transferidos para eppendorfs imersos em gelo e centrifugados a 12.000g, por 20 minutos a 4°C. Os extratos foram mantidos em banho de gelo no decorrer das análises. Para cada extrato foram realizadas três leituras para cada enzima analisada. As leituras de absorbância para o cálculo de atividade das peroxidases totais e siringaldazina oxidase foram realizadas com intervalos de dez segundos, num período de um minuto e meio, em espectrofotômetro Hewlett Packard, modelo 8453.

Na análise de atividade de peroxidases totais (EC 1.11.1.7) foi utilizado o teste de guaiacol, no qual cada 1mL do meio de reação continha: 50mM de tampão de reação de

fosfato de sódio (pH 5,7), 0,1M de peróxido de hidrogênio, 1,2mM de solução de guaiacol e 35µL de extrato. As leituras foram realizadas em 470nm à temperatura de 25°C.

Para análise da atividade da enzima siringaldazina oxidase (EC 1.11.1.7), cada 1mL do meio de reação foi constituído de: 50mM de tampão de reação de fosfato de sódio monobásico (pH 7,4), 54mM de peróxido de hidrogênio, 19µM de solução de siringaldazina e 15µL de extrato. As leituras foram obtidas em 530nm à temperatura de 35°C.

#### 3.3.2 Localização de Peroxidases Totais e Siringaldazina Oxidase

A avaliação da localização histoquímica da atividade de peroxidases totais e siringaldazina oxidase é um teste qualitativo que permite a observação da distribuição da atividade destas enzimas no tecido analisado.

A localização histoquímica da atividade de peroxidases na raiz principal das plantas foi obtida a partir da impressão do tecido vegetal em membranas de nitrocelulose (com poros de 200µm - Sigma). Porções da raiz principal, com cerca de 1 - 3 mm foram pressionadas sobre as membranas, com auxílio de um bastão de vidro. Para localização de peroxidases totais, foi utilizado o método descrito por Young (1989). Adicionou-se à membrana de nitrocelulose impressa, 4,5mL de tampão PBS, 1µL de peróxido de hidrogênio a 30% e 0,5mL de substrato 4-cloro-naftol (6mg/ml de metanol). As membranas foram transferidas para placas de Petri e mantidas sobre agitador orbital sob ausência de luz, até a que a coloração estivesse evidente a olho nu. Em seguida, foram lavadas com água destilada e conservadas envolvidas em folhas de papel de filtro até a análise.

A localização de siringaldazina oxidase foi determinada segundo Catesson (1980 citado por Goldberg *et al.*, 1983) com modificações. Após o processo de impressão, a membrana foi depositada entre duas folhas de papel de filtro. Adicionou-se à membrana

1,2mL de tampão fosfato de sódio monobásico 50mM, 0,8mL de peróxido de hidrogênio a 0,1% e 0,3mL de substrato siringaldazina a 0,1% em etanol. Ao observar coloração evidente, a membrana foi transferida para papel de filtro seco, para remover o excesso de meio de reação.

As amostras foram conservadas envolvidas em papel de filtro até o exame. Para a avaliação do material obtido, as membranas foram fixadas em lâminas de vidro. As análises e os registros fotográficos das membranas foram realizados no microscópio óptico Olympus modelo BX 40.

#### 3.4 Efeito da Salinidade na Integridade da Membrana Plasmática

#### 3.4.1 Determinação da Perda de Eletrólitos

A dosagem de liberação de eletrólitos de raízes foi realizada a partir da determinação da condutância elétrica segundo o método de Bataglia *et al.* (1978 citado por Haddad & Mazzafera, 1999), com modificações. Para calibrar o aparelho foi utilizada solução de cloreto de potássio 0,01N. As plantas foram removidas do vaso delicadamente, para evitar lesões nas raízes. As raízes foram lavadas com água de torneira, a fim de remover sais de sua superfície. As raízes das plantas foram mergulhadas em um béquer contendo 200mL de água deionizada. Durante três minutos, a água deionizada foi homogeneizada e após este período foi realizada a leitura em condutivímetro, Analyser modelo 650.

#### 3.5 Efeito da Salinidade nas Relações Iônicas

### 3.5.1 Determinação da Razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>

As determinações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram realizadas de acordo com a técnica de fotometria de chama segundo Bataglia *et al.* (1983), no Laboratório de Análise de Solo e Planta, da Seção de Fertilidade do Solo, do Instituto Agronômico de Campinas. As plantas foram retiradas dos
vasos e lavadas com água corrente de torneira e destilada. A seguir, foram separadas raízes e folhas, obtendo-se a massa fresca de ambas. As amostras foram colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa a 60°C, por 72hs. Após este período, foram transferidas para um dessecador até alcançar a temperatura ambiente e levadas para análise. Para a análise das amostras realizou-se digestão via seca.

## 3.6 Efeito da Salinidade em Parâmetros Bioquímicos

### 3.6.1 Dosagem de Proteínas Solúveis Totais

A dosagem de proteínas foi realizada seguindo o método desenvolvido por Bradford (1976). Foi utilizado soro albumina bovina ( $20 - 100\mu g$ ) para curva-padrão e para o branco foi empregado reagente de Bradford. Para análise do material, utilizou-se 400mg de cada amostra, macerados com nitrogênio líquido e transferidos para frasco âmbar com 4mL de NaOH a 0,1N, por 24hs. O extrato foi centrifugado a 1.200g, durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para frascos translúcidos. Em tubos de ensaio foram depositados 20 $\mu$ L do sobrenadante com 80 $\mu$ L de água destilada e adicionados 5mL de solução de Bradford. As leituras foram realizadas em 595nm, em espectrofotômetro FEMTO 600.

### 3.6.2 Dosagem de Açúcares

# 3.6.2.1 Extração de Açúcares

As extrações foram realizadas a partir de folhas e raízes (conforme Figura 1). As amostras foram coletadas, lavadas com água de torneira e destilada e secas em papel absorvente. Utilizou-se cerca de 300mg de amostra, que foram macerados com nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubos de vidro, com 3mL de MCW (metanol: clorofórmio: água) na proporção de 12:5:3, para efetuar a extração (Bieleski & Turner, 1966).

Após 30hs, o extrato foi centrifugado a 1.200g por 5 minutos. A fração sobrenadante foi recuperada em proveta, e para cada 4mL foram acrescentados 1mL de clorofórmio e 1,5mL de água destilada. Agitou-se vigorosamente. Após um repouso de 24hs, a fração aquosa do extrato foi recuperada com auxílio de pipeta Pasteur, sendo descartada a fração contendo clorofórmio. Da fração aquosa, foi extraído 1mL, o qual foi transferido para tubo de ensaio, que foi armazenado à temperatura ambiente por 21hs, para eliminação de resíduo de clorofórmio. Ao final, o volume das amostras foi medido e transferido para eppendorf, sendo estas centrifugadas a 14.000g por 5 minutos. As amostras foram conservadas em freezer até análise.



Figura 1. Fluxograma de extração de metabólitos para dosagem de açúcares e sacarose em raízes de *Vigna luteola* e *Vigna unguiculata*.

### 3.6.2.2 Dosagem de Açúcares Solúveis Totais

A dosagem de açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com o método do fenol sulfúrico, segundo Dubois *et al.* (1956). Para curva-padrão foi utilizada sacarose (5-50µg) e para o branco foi utilizado o meio de reação. Para cada amostra, foram empregados 20µL do extrato de folhas ou 50µL do extrato de raízes. Em tubos de ensaio foram adicionados 480µL ou 450µL de água destilada, 500µL de fenol a 5% e 2mL de ácido sulfúrico concentrado. Cada tubo foi agitado vigorosamente e mantido em temperatura ambiente até o resfriamento. As leituras foram realizadas em 490nm em espectrofotômetro FEMTO 600.

# 3.6.2.3 Dosagem de Sacarose

O teor de sacarose foi determinado segundo Handel (1968). Para curva-padrão foi utilizada sacarose (5-50µg) e para o branco foi utilizado o meio de reação. Para cada amostra, foram utilizados 20µL do extrato de folhas. Em tubos de ensaio, foram adicionados 230µL de água destilada e 250µL de hidróxido de potássio a 30%. Os tubos foram vedados com bolinhas de gude e mantidos a 100°C por 30 minutos. Após o resfriamento, cada amostra recebeu 500µL de fenol a 5% e 2mL de ácido sulfúrico concentrado. Cada tubo foi agitado vigorosamente e mantido em temperatura ambiente até o resfriamento. As leituras foram realizadas em 490nm em espectrofotômetro FEMTO 600.

# 3.6.4 Dosagem de Malondialdeído

O grau de peroxidação na raiz foi verificado pela reação do ácido tiobarbitúrico, que determina a concentração de malondialdeído (um produto da peroxidação de lipídios), segundo Heath e Packer (1968) com modificações. O material vegetal foi coletado e congelado em freezer e posteriormente liofilizado. Foram macerados 100mg de cada amostra

em 2mL de ácido tricloroácetico a 0,1%, contendo 20% de polivinilpirrolidona. Após a total homogeneização, o extrato foi centrifugado a 10.000g por 5 minutos. Adicionou-se 2mL de ácido tricloroacético a 20%, contendo ácido tiobarbitúrico a 0,5%, em 500µL de sobrenadante. A mistura foi mantida por 30 minutos a 95°C e posteriormente resfriada em banho de gelo. Para separar os resíduos formados durante o aquecimento e clarear a amostra, esta foi centrifugada a 10.000g por 10 minutos. As absorbâncias foram medidas em 600nm e subtraídas dos resultados da leitura das absorbâncias em 535nm (absorbância não específica que pode ser causada por turbidez). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Pharmacia Biotech Ultraspec 100. O cálculo do teor de malondialdeído foi determinado de acordo com a fórmula:

C = (Abs 535 - Abs 600nm) x E = mmol de malondialdeído/g massa fresca

Onde:

C - Concentração de malondialdeído

Abs - Absorbância

E – Coeficiente de extinção malondialdeído (155mmol cm<sup>-1</sup>)

## 3.7 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os vasos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado. Nas análises de peroxidases e malondialdeído foram usadas três replicações por tratamento. Nos experimentos de dosagem de açúcares e proteínas foram utilizadas cinco replicações por tratamento. Para avaliar a condutividade elétrica em raiz foram empregadas oito replicações por tratamento. Na avaliação dos parâmetros de crescimento foram utilizadas dez replicações por tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No ensaio em que foram avaliadas as concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> em folhas e raízes, não foi possível realizar a análise estatística, pois *V. luteola* apresenta massa vegetal muito pequena, abaixo de 2,5g de massa seca, valor mínimo para se efetuar o ensaio. Dessa forma, foi estabelecida uma única réplica por tratamento, constituída pela massa seca de todas as plantas de um mesmo tratamento. O número de plantas variou por réplica (tratamento controle: *V. luteola* - 20 plantas e *V. unguiculata* – 5 plantas; 250mM de NaCl: *V. luteola* - 19 plantas e *V. unguiculata* – 9 plantas; 500mM de NaCl: *V. luteola* - 19 plantas e *V. unguiculata* – 10 plantas).

#### 4. Resultados

## 4.1 Efeito da Salinidade no Crescimento

As massas frescas de raiz e caule de plantas de *V. luteola* mantiveram-se estáveis em todos os tratamentos (Figura 2A e 2C). Já em relação às folhas, ocorreu uma ligeira diferença neste parâmetro com o incremento de NaCl no meio de cultivo, sendo que o tratamento de 250mM apresentou maior queda de massa em relação ao controle (Figura 2E). Em *V. unguiculata*, houve uma tendência de perda de massa fresca em raiz, caule e folhas, com o acréscimo de sal no substrato (Figura 2B, 2D e 2F).

Os valores de massa seca de raiz, caule e folhas de *V. luteola* nos tratamentos que receberam sal não variaram em relação ao controle (Figura 3A, 3C e 3E). Nas plantas de *V. unguiculata*, houve redução de massa seca de raiz nos tratamentos de 250mM e 500mM (Figura 3B) e de caule apenas na concentração de 500mM (Figura 3D). Já em relação às folhas, ocorreu uma redução altamente significativa de cerca de 45% no tratamento de 250mM e 600mM de sal (Figura 3F).

Não houve decréscimo da massa seca livre de cinzas de raiz, caule e folhas de plantas de *V. luteola* submetidas à condição salina em relação ao controle (Figura 4A). A espécie *V. unguiculata* apresentou comportamento distinto. Com o aumento na concentração de NaCl, ocorreu redução gradativa na matéria orgânica na raiz, caule e folhas (Figura 4B). Os tratamentos controle e 100mM apresentaram maior conteúdo de matéria orgânica na raiz. Em relação ao caule, foram encontrados valores semelhantes no controle, 100mM e 250mM. As folhas representaram a porção da planta que apresentou maior redução de massa seca livre de cinzas com incremento de NaCl: cerca de 25% com 100mM, 40,5% com 250mM e 57,8% no tratamento de 500mM.



**Figura 2 -** Massas Frescas das espécies de *Vigna* após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Raiz: A – *V. luteola* e B – *V.unguiculata*, Caule: C - *V. luteola* e D - *V.unguiculata*, Folhas: E - *V. luteola* e F - *V.unguiculata*. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).



**Figura 3 -** Massas Frescas das espécies de *Vigna* após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Raiz: A – *V. luteola* e B – *V.unguiculata*, Caule: C - *V. luteola* e D - *V.unguiculata*, Folhas: E - *V. luteola* e F - *V.unguiculata*. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).





**Figura 4** – Massa Seca Livre de Cinzas (MSLC) de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos para o mesmo órgão (Tukey a 5%).

Não ocorreu redução significativa na área foliar de plantas de *V. luteola* com o aumento da salinidade, apesar de uma ligeira redução nos valores médios obtidos nos tratamentos de 250mM e 500mM (Figura 5A). Resultados distintos foram encontrados nas amostras de *V. unguiculata*. Observou-se decréscimo gradativo na área foliar concomitante à elevação da concentração de sais no meio de cultivo (Figura 5B). Em relação ao controle, as quedas das áreas foliares foram de 14,34% (100mM), 40,78% (250mM) e 45,78% (500mM).

O número de folhas não foi alterado nas plantas de *V. luteola* na presença de sal (Figura 6A). Para *V. unguiculata*, o número médio de folhas declinou de 8 (controle) para 4 (500mM), representando uma redução altamente significativa neste parâmetro (Figura 6B).

A análise de massa foliar específica permitiu observar que em plantas de *V. luteola* há manutenção dos valores nas plantas sob tratamento salino (100mM e 250mM) em relação ao controle, com acréscimo de massa seca por área foliar sob 500mM de NaCl (Figura 7A). Este parâmetro variou de forma significativa na espécie *V. unguiculata*, com perda de matéria seca por área foliar sob 500mM de NaCl (Figura 7B).

Em ambas as espécies de *Vigna* não ocorreram variações nos resultados do teor de suculência foliar das plantas submetidas ao tratamento salino em relação ao controle (Figura 8A e 8B).

A salinidade não alterou o comprimento da raiz em *V. luteola* (Figura 9A). Em *V. unguiculata*, houve aumento neste parâmetro com o acréscimo de sal no meio externo (Figura 9B).

Em V. luteola, o comprimento da parte aérea aumentou sob 100mM, mantendo-se semelhante ao controle nos demais tratamentos salinos (Figura 10A). Em V. unguiculata, a salinidade reduziu o comprimento da parte aérea em todos os tratamentos com NaCl (Figura 10B).

As amostras de *V. luteola* submetidas ao estresse salino produziram resultados semelhantes ao controle no parâmetro comprimento da raiz/ comprimento da parte aérea (Figura 11A). Enquanto que, nas amostras de *V. unguiculata* ocorreu aumento dessa razão proporcional ao acréscimo de sal, com maiores valores médios nas concentrações de 250mM e 500mM de NaCl e diferença significativa dos demais tratamentos desta espécie (Figura 11B).

A razão massa seca da raiz/massa seca da parte aérea não variou com a salinidade nas plantas de *V. luteola* e *V. unguiculata* (Figura 12A e 12B).



**Figura 5** – Área Foliar de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).



**Figura 6** – Número de Folhas de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).



**Figura 7** – Massa Foliar Específica (MFE) de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).



**Figura 8** – Teor de Suculência de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).



**Figura 9 – C**omprimento de raiz *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).



**Figura 10 – C**omprimento da parte aérea *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).



**Figura 11 –** Razão do comprimento da raiz/comprimento da parte aérea de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).



**Figura 12** – Razão massa seca da raiz/massa seca da parte aérea de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).

## 4.2 Efeito da Salinidade em Peroxidases

## 4.2.1 Determinação da Atividade de Peroxidases Totais e Siringaldazina Oxidase

A atividade de peroxidases totais na espécie *Vigna luteola* variou entre os tratamentos, de forma não significativa nos tratamentos 100mM e 500mM de NaCl. Contudo, nesta espécie, sob 250mM de NaCl houve aumento significativo da atividade de peroxidases (Figura 13A). Em *Vigna unguiculata*, não houve variação na atividade de peroxidases totais submetidas ao estresse salino (Figura 13B).

A atividade de siringaldazina oxidase não foi alterada nas plantas de *V. luteola* cultivadas em substrato contendo NaCl (Figura 13C). Já em plantas de *V. unguiculata*, a adição do agente estressor ao meio de cultivo gerou o acréscimo de atividade desta enzima no tratamento de 250mM de NaCl (Figura 13D).

Também foi verificado que os resultados das atividades de peroxidases totais e siringaldazina oxidase em *V. luteola* eram superiores aos obtidos na espécie *V. unguiculata.* Para peroxidases totais os valores médios foram de duas a três vezes maiores e para siringaldazina oxidase estes resultados foram duas vezes maiores em *V. luteola* (Figura 12).



Figura 13 - Atividade de Peroxidases em raízes das espécies de Vigna após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Peroxidases Totais (A - V. luteola e B - V. unguiculata) e Siringaldazina Oxidase (C -V. luteola e D - V. unguiculata ). Médias com letras minúsculas distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%). Médias com letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre as espécies comparando-se o mesmo tratamento (Tukey a 5%).

0

Controle

100mM

250mM

500mM

0

Controle

100mM

250mM

500mM

#### 4.2.2 Localização de Peroxidases Totais e Siringaldazina Oxidase

Foram realizadas análises para todos os tratamentos estudados (controle, 100mM, 250mM e 500mM de NaCl), porém devido à fragilidade do tecido da raiz, principalmente em *V. luteola*, a preservação de detalhes anatômicos foi dificultada. Na localização histoquímica de peroxidases, o substrato empregado foi o 4-cloro-naftol, que produz um precipitado preto e insolúvel (Figura 14). Para a localização da atividade de siringaldazina oxidase foi empregado o substrato siringaldazina, que produz precipitação rosa e solúvel (Figura 15). Cada corte da raiz foi pressionado sob a membrana de nitrocelulose cerca de 4 vezes, pois no primeiro corte a reação era muito intensa não permitindo visualizar com detalhes a localização da atividade.

Entre as impressões de raízes de *V. luteola*, foi verificado que na ausência do agente estressor, a atividade de peroxidases totais está localizada principalmente na epiderme, embora também ocorra em menor intensidade no córtex e cilindro central. Sob estresse, a reação foi mais intensa e mais ampla no córtex e feixe vascular e epiderme. Nas impressões de plantas do tratamento controle de *V. unguiculata*, foi observado que a localização da atividade de peroxidases totais está limitada à epiderme e cilindro central. Sob salinidade, a localização da atividade de peroxidases foi intensificada na epiderme e cilindro central e também foi observada na região córtex (Figura 14).

A atividade de siringaldazina oxidase, em raízes de *V. luteola* no tratamento controle, foi observada na epiderme e nos cilindros centrais, embora pouco intensa. Com acréscimo de 500mM de NaCl no substrato, foi observada atividade em todas as regiões da raiz com muita intensidade, o que não permitiu a visualização de detalhes anatômicos. Em *V. unguiculata*, a atividade da enzima siringaldazina nas impressões de plantas controle (dados não mostrados) e sob 100mM de sal foi observada somente na epiderme. No entanto, sob alta concentração de NaCl (500mM), a localização desta enzima foi ampliada por todas as regiões da raiz, sendo mais intensa na epiderme (Figura 15).



**Figura 14** – Localização de Peroxidases Totais em raízes de *Vigna luteola* e *Vigna unguiculata* após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Legenda: \* - Cilindro Central, \*\* - Córtex, \*\*\* - Epiderme.



**Figura 15 –** Localização de Siringaldazina em raízes de *Vigna luteola* e *Vigna unguiculata* após tratamento com diferentes concentrações de NaCl Legenda: \* - Cilindro Central, \*\* - Córtex, \*\*\* - Epiderme.

## 4.3 Efeito da Salinidade na Integridade de Membrana Plasmática

#### 4.3.1 Determinação de Perda de Eletrólitos

Em ambas as espécies houve um aumento da perda de eletrólitos das raízes com o aumento de sal no substrato de crescimento. Em *V. luteola*, houve um resultado médio 2,5 vezes maior sob 500mM de NaCl, em relação ao controle (Figura 16A). Nas plantas de *V. unguiculata* submetidas ao estresse salino, foi possível notar um acréscimo significativo na liberação de eletrólitos da ordem de 2 vezes sob 250mM de NaCl e de 4 vezes sob 500mM (Figura 16B).

Comparando-se as duas espécies, dentro de cada tratamento, observou-se que *V*. *unguiculata* teve maior liberação iônica para o meio externo que *V*. *luteola* e que, sob estresse salino, o aumento na liberação de eletrólitos em *V*. *unguiculata* é muito mais expressivo.



**Figura 16** – Condutância Elétrica em raízes de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras minúsculas distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie segundo Tukey a 5%. Médias com letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre as espécies comparando-se o mesmo tratamento (Tukey a 5%).

#### 4.4 Efeito da Salinidade nas Relações Iônicas

# 4.4.1 Determinação da Razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>

Ambas espécies apresentaram aumento de Na<sup>+</sup> e redução de K<sup>+</sup> em raízes e folhas, sob estresse salino (Tabelas 1 e 2).

Em raízes, *V. luteola* acumulou maior teor de Na<sup>+</sup> que *V. unguiculata* nos tratamentos avaliados (Tabela 1). O acréscimo de Na<sup>+</sup> em *V. luteola* foi da ordem de 9 vezes sob 250mM e 10 vezes em 500mM em relação ao controle, enquanto em *V. unguiculata* este aumento foi de 7 vezes (250mM) e 9 vezes (500mM) em relação ao controle.

Nas amostras de *V. luteola*, ocorreu redução de 4% no teor do íon K<sup>+</sup> sob 250mM de NaCl. Já, sob 500mM, houve queda de 35% na concentração deste elemento. De modo semelhante, na espécie *V. unguiculata* o acréscimo de NaCl no substrato levou à redução de K<sup>+</sup> em ambos os tratamentos salinos, embora esta redução tenha sido muito maior (25% sob 250mM e 44% sob 500mM de NaCl).

Em raiz, a razão Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>, sempre foi maior na espécie V. luteola (Tabela 1).

Nas duas espécies de *Vigna* ocorreu acúmulo de Na<sup>+</sup> nas folhas (Tabela 2). Este aumento foi mais marcante na espécie *V. unguiculata*, onde se encontrou 33 vezes mais Na<sup>+</sup> no tratamento de 500mM de NaCl que no controle. Enquanto em *V. luteola*, neste mesmo tratamento, o teor de Na<sup>+</sup> foi cerca de 18 vezes maior que o controle.

Quanto ao K<sup>+</sup>, em ambos tratamentos (250mM e 500mM) de sal houve redução deste mineral, sendo maior o impacto em *V. luteola* (cerca de 20% em 250mM e 17% sob 500mM de NaCl). Em *V. unguiculata* a queda de K<sup>+</sup> foi 16% sob 250mM e 6% em 500mM.

Em folhas, o comportamento da relação Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup> foi distinto nas duas espécies (Tabela 2). Em *V. luteola*, houve um aumento de 29 vezes sob 250mM em relação ao controle e de 20

vezes em 500mM. Em *V. unguiculata*, o acréscimo desta razão foi de 12 vezes sob 250mM e 37 vezes sob 500mM.

Em geral, a queda da razão  $Na^+/K^+$  está relacionada com o acúmulo de  $Na^+$  e redução na concentração de  $K^+$  nas raízes e parte aérea das duas espécies.

**Tabela 1 –** Concentração de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> ( $\mu$ mol/g MS) e razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> em raízes de *Vigna luteola* e *Vigna unguiculata* após tratamento com diferentes concentrações de NaCl.

Tratamento	V. luteola			V. unguiculata		
	<b>K</b> <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup>	<b>K</b> <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup>
0mM	854,26	91,00	0,11	905,42	60,90	0,07
250mM	821,01	791,73	0,96	680,34	404,56	0,59
500mM	552,46	891,78	1,61	503,86	526,37	1,12

**Tabela 2** – Concentração de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> ( $\mu$ mol/g MS) e razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> em folhas de *Vigna luteola* e *Vigna unguiculata* após tratamento com diferentes concentrações de NaCl.

Tratamento	V. luteola			V. unguiculata		
	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup>
0mM	785,21	21,75	0,03	1043,52	21,75	0,02
250mM	629,19	539,42	0,86	874,73	208,81	0,24
500mM	654,76	395,86	0,61	977,03	726,48	0,74
500mM	654,76	395,86	0,61	977,03	726,48	0,74

### 4.5 Efeito da Salinidade em Parâmetros Bioquímicos

#### 4.5.1 Dosagem de Proteínas Solúveis Totais

O teor de proteínas não foi alterado sob tratamento salino em *V. luteola* (Figura 17A). Porém, na espécie *V. unguiculata*, com a aumento da concentração de NaCl, ocorreu uma ueda relevante no conteúdo de proteínas (Figura 17B).

Ainda foi observado que nas plantas de *V. unguiculata* o teor protéico foi maior que em de *V. luteola* no tratamento controle (20%) e 100mM (17%), sob condições mais rigorosas de estresse, o conteúdo protéico é maior em *Vigna luteola*.



**Figura 17** – Proteínas Solúveis em folhas de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras minúsculas distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%). Médias com letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre as espécies comparando-se o mesmo tratamento (Tukey a 5%).

## 4.5.2 Dosagem de Açúcares Solúveis Totais

O teor de açúcares solúveis não foi alterado em raízes de ambas as espécies avaliadas, em condições de estresse (Figura 18). Confrontando os resultados das duas espécies nos mesmos tratamentos foi possível notar que em *Vigna unguiculata* há maior concentração deste soluto, mesmo sob salinidade mediana (250mM). Quando em condições mais severas de estresse (500mM), ambas espécies tendem a acumular o mesmo teor de carboidratos na raiz (Figura 18A e18B).

Em folhas não houve variação significativa no conteúdo de açúcares solúveis sob salinidade em *V. luteola* e *V. unguiculata* (Figura 19A e19B). O teor de carboidratos foi superior em *V. luteola*, sob estresse, comparando-se aos mesmos tratamentos de *V. unguiculata*. Enquanto que, em condições ideais de cultivo, em ambas espécies os resultados obtidos foram semelhantes.



**Figura 18** – Açúcares Solúveis Totais em raiz de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras minúsculas distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%). Médias com letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre as espécies comparando-se o mesmo tratamento (Tukey a 5%).



**Figura 19** – Açúcares Solúveis Totais em folhas de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras minúsculas distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%). Médias com letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre as espécies comparando-se o mesmo tratamento (Tukey 5%).

## 4.5.3 Dosagem de Sacarose

O conteúdo de sacarose não foi afetado pela presença de NaCl no substrato, nas duas espécies de *Vigna*. Além disso, ao comparar-se os resultados das duas espécies dentro dos mesmos tratamentos, observou-se que os valores eram correspondentes (Figura 20A e 20B).



**Figura 20** – Teor de Sacarose em folhas de *Vigna luteola* (A) e *Vigna unguiculata* (B) após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras minúsculas distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%). Médias com letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre as espécies comparando-se o mesmo tratamento (Tukey a 5%).

# 4.5.4 Dosagem de Malondialdeído

O teste foi realizado somente em plantas da espécie *Vigna unguiculata*, pois a massa seca mínima para esta determinação não foi obtida nas amostras de *Vigna luteola*.

O conteúdo de malondialdeído em raiz não variou de maneira significativa nos tratamentos contendo NaCl em relação ao controle. Foi observada uma tendência de queda na sua concentração sob condições mais severas de salinidade (Figura 21).



**Figura 21** – Teor de Malondialdeído (MDA) em raiz de *Vigna unguiculata* após tratamento com diferentes concentrações de NaCl. Médias com letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os tratamentos da mesma espécie (Tukey a 5%).

### 5. Discussão

De acordo com Larcher (2000), os processos de crescimento são particularmente sensíveis ao efeito do sal, de forma que a taxa de crescimento e a produção de biomassa são bons critérios para avaliação do grau de estresse e da capacidade da planta em superar a salinidade.

A massa fresca de *V. luteola* apresentou redução somente em folhas e as massas secas de raiz, caule e folhas não variaram. Vaidyanathan *et al.* (2003) observaram que em um cultivar de arroz resistente ao sal, houve queda de massa fresca total da planta e manutenção de massa seca total da planta. A massa seca livre de cinzas também não foi alterada em *V. luteola.* 

Em *V. unguiculata*, houve redução de massas fresca e seca de raiz, caule e folhas. Inúmeros trabalhos indicam que sob estresse salino, cultivares sensíveis apresentam redução nestes parâmetros (Seemann & Critchley, 1985; Rawat & Banerjee, 1998; Haddad & Mazzafera, 1999; Flowers & Hajibagheri, 2001; Wei *et al.*, 2003). As massas secas livres de cinzas de raiz, caule e folhas também foram reduzidas nesta espécie, sob estresse salino.

A queda da massa fresca das plantas de *V. unguiculata* pode estar relacionada com o efeito osmótico da salinidade, que abaixa o potencial osmótico da solução do solo e inibe a condução da água em direção às células, caracterizando o estresse hídrico (Marcelis & Hooijdonk, 1999; Tester & Davenport, 2003).

A queda de massa seca pode refletir o aumento da respiração, que é acelerada em condições de estresse, ganho reduzido de carbono (Greenway & Munns, 1980; McCree, 1986; Zhu, 2001; Lee *et al.*, 2004) e/ou suprimento inadequado de nutrientes para a planta (Marcelis & Hooijdonk, 1999; Debez *et al.*, 2004).

A salinidade tem um impacto negativo sobre as folhas. Em algumas espécies, como arroz, algodão, trigo, sorgo, *Cakile maritima*, *Hydrocotyle bonariensis*, *Foeniculum vulgare* e *V. radiata*, sob condições de estresse salino, foi observada a queda da área foliar (Okusanya e Oyesiku, 1994; Munns *et al.*, 1995; Lutts *et al.*, 1996; Leidi & Saiz, 1997; Zayed & Zeid, 1997/98; Haddad & Mazzafera, 1999; Debez *et al.*, 2004; Netondo *et al.*, 2004). Neste trabalho, a salinidade levou a uma redução severa na área foliar em *V. unguiculata*. O mesmo resultado foi obtido por Costa *et al.* (2003), quando avaliou este parâmetro nesta mesma variedade. A área foliar de *V. luteola* não foi alterada sob estresse salino. No entanto, *V. luteola* apresentou aumento de área foliar quando cultivada em hidroponia com água do mar na concentração de 70% da água do mar (Okusanya e Oyesiku, 1994).

A queda da área foliar pode ser atribuída à senescência ou reduzida taxa de crescimento (Bernstein *et al.*, 1993). Esta queda pode ser a principal causa da diminuição do ganho de carbono e do crescimento reduzido da planta sob estresse salino, pois leva à queda de 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).

O estresse salino também é responsável pela redução do número de folhas (Okusanya e Oyesiku, 1994; Rawat & Banerjee 1998; Ghoulam *et al.*, 2002; Debez *et al.*, 2004). A presença de NaCl no meio externo não levou à variação no número de folhas em *V. luteola.* Contudo, ocorreu uma severa queda no número de folhas de *V. unguiculata* nesta mesma condição. Segundo Netondo *et al.* (2004), a redução do teor de Ca<sup>2+</sup> nas folhas mais velhas implica num bloqueio do desenvolvimento de novas folhas.

Em *V. luteola*, a massa foliar específica aumentou com o incremento de NaCl. Em *V. unguiculata*, a massa foliar específica foi significativamente menor sob salinidade severa. Este

resultado está de acordo com o obtido por Costa *et al.* (2003), que trabalhou com a mesma espécie.

Plantas sob estresse salino apresentam características xeromórficas como folhas menores, área de transpiração reduzida e maior massa foliar/área foliar. Estas características provavelmente ajudam a planta a manter um conteúdo maior de água sob condições de estresse hídrico, pois diminui a perda de água (Polyjakoff-Mayber & Gale, 1975 citado Bray & Reid, 2002).

A suculência não variou nas duas espécies de *Vigna*. Em *Cakile maritima* e *Phaseolus vulgaris* houve aumento na suculência foliar sob estresse salino (Seemann & Critchley, 1985; Debez *et al.*, 2004). Resultados diferentes dos nossos foram encontrados por Costa *et al.* (2003) com *V. unguiculata*, que apresentou aumento de suculência foliar com aumento da salinidade. Estes resultados distintos podem estar relacionados com o método de cultivo (hidroponia, onde os sais estão em contato permanente com as raízes) e estágio de desenvolvimento (14 dias após germinação) do cultivar analisado.

O espessamento foliar, em decorrência do acúmulo de água nas células, está relacionado com a maior tolerância ao estresse salino (Greenway & Munns, 1980; Costa *et al.* 2003) e visa evitar o déficit hídrico e reduzir a concentração de sais no protoplasma (Larcher, 2000).

A razão MS raiz/MS parte aérea de *Phaseolus vulgaris* aumentou sob estresse, quando cultivado em substrato vermiculita:perlita (1:1 v/v) e sob concentrações de NaCl entre 25mM a 150mM, devido à queda de massa seca da parte aérea nesta espécie (Seemann & Critchley, 1985). Em *V. luteola* e *V. unguiculata* não houve variação deste parâmetro sob salinidade.

A razão comprimento raiz/parte aérea não variou em V. luteola sob estresse salino. Resultado semelhante foi obtido por Okusanya e Oyesiku (1994). Este parâmetro aumentou com o acréscimo de sal no meio externo em *V. unguiculata*, em decorrência do aumento do comprimento da raiz e redução da parte aérea.Costa *et al.* (2003) obtiveram resultado similar com o mesmo cultivar, cultivado sob hidroponia. Contudo, Okusanya e Oyesiku (1994) avaliaram a razão do comprimento da parte aérea/raiz em *V. vexillata*, uma espécie de baixa resistência ao sal, quando cultivada sob diferentes concentrações da água do mar e observaram o aumento deste parâmetro.

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. Contudo, para Flowers & Hajibagheri (2001), a ausência de efeito da salinidade neste parâmetro já é indicativo de que a espécie é tolerante ao estresse salino, pois mantém seu crescimento normal sob condição adversa de crescimento.

Recentemente muitos trabalhos têm indicado que a aquisição da tolerância ao estresse salino pode ser conseqüência do controle eficiente do estresse oxidativo (Hernández *et al.*, 2001). As peroxidases são consideradas antioxidantes que protegem as células contra danos causados pelo peróxido de hidrogênio (Minibaeva & Gordon, 2003). Sua alta atividade tem sido associada com a tolerância à salinidade (Mittova *et al.*, 2002; Meloni *et al.*, 2003). A maior tolerância de *V. luteola* ao estresse salino, pode estar relacionada ao fato desta espécie ter apresentado atividade de peroxidases totais muito superior à de *V. unguiculata*.

Em *V. luteola* a atividade de siringaldazina oxidase não foi alterada pela salinidade, já, m *V. unguiculata* houve aumento da atividade desta enzima sob estresse salino. Lin & Kao (1999), observaram o aumento da atividade de siringaldazina oxidase em arroz sob estresse salino. Peyrano *et al.* (1997) também observaram a elevação da atividade desta enzima em tomateiro em condições de salinidade. O enrijecimento da parede celular tem sido relacionado com inibição do crescimento radicular (comprimento) por alguns pesquisadores (Neumann *et al.*, 1994). Goldberg *et al.* (1983), sugeriram que a enzima siringaldazina oxidase está envolvida diretamente com o processo de lignificação e conseqüente enrijecimento da parede celular. Em *V. unguiculata*, houve aumento da atividade de siringaldazina oxidase sob salinidade, contudo foi constatado o aumento do comprimento da raiz.

Goldberg *et al.* (1983) demonstraram a localização da atividade de siringaldazina em células do xilema e fibras do floema em plantas de *Populus*. Somente em células onde o processo de lignificação havia sido iniciado foi localizada esta enzima. Peyrano *et al.* (1997) localizaram a atividade de siringaldazina oxidase nos vasos do xilema e camadas subepidérmicas em tomateiro sob estresse salino.

A atividade de siringaldazina oxidase foi localizada na epiderme *V. unguiculata* e em *V. luteola* na epiderme e cilindro central. Em ambas espécies, sob estresse salino houve aumento na intensidade da reação, principalmente em *V. luteola*, onde foi identificada em todas as regiões da raiz a atividade da enzima siringaldazina oxidase.

A presença de NaCl no meio de cultivo causa distúrbio na permeabilidade da membrana. Esta alteração pode ser evidenciada pelo aumento da liberação de solutos (Borochov-Neori & Borochov, 1991; Ghoulam *et al.*, 2002). Aumentos significativos na liberação de eletrólitos foram observados em ambas as espécies de *Vigna*. Nos tratamentos de 250mM e 500mM de NaCl, foram obtidos os valores mais expressivos deste parâmetro, os quais correspondiam à espécie *V. unguiculata*. Os dados obtidos sugerem que a permeabilidade da membrana plasmática foi severamente comprometida pelo estresse salino.

Estudos anteriores que utilizaram a liberação de solutos como indicador de injúria na membrana plasmática, reportaram que em resposta à salinidade, em cultivares sensíveis houve um grande aumento de liberação de solutos em comparação aos cultivares resistentes (Ghoulam *et al.*, 2002; Mansour & Salama, 2004). A comparação das duas espécies de *Vigna* dentro de cada tratamento demonstrou que a perda de eletrólitos é significativamente maior em *V. unguiculata* em todos os tratamentos, sugerindo uma maior sensibilidade ao sal nesta espécie. Contudo, estes resultados podem refletir não apenas a perda da integridade da membrana celular, mas também a saída de sódio acumulado no apoplasto destas espécies.

A localização do Na<sup>+</sup> na planta também parece ser importante, já que nas espécies mais resistentes ao sal, este íon fica concentrado nas raízes (Suhayda *et al.*, 1992; Okusanya & Oyesiku, 1994). O teor de Na<sup>+</sup> nas raízes das duas espécies de *Vigna* aumentou com o concentração de NaCl no meio externo. No entanto, a espécie *V. luteola* destaca-se pelo acúmulo muito elevado de Na<sup>+</sup> em suas raízes e menor teor de K<sup>+</sup> em comparação à *V. unguiculata*.

Em folhas de *Vigna unguiculata* ocorreu um acréscimo progressivo na concentração de  $Na^+$  com o aumento da salinidade. Embora *V. luteola* tenha apresentado mais  $Na^+$  que *V. unguiculata* nas raízes, ela tem menor concentração deste íon nas folhas sob alta salinidade, sugerindo que esta espécie é mais eficiente na regulação do transporte iônico para a parte aérea.

A razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> aumentou em raízes e em folhas de ambas espécies de *Vigna* na presença do agente estressor. Alguns trabalhos (Okusanya & Oyesiku, 1994; Wei *et al.*, 2003) indicam que em espécies tolerantes e sensíveis há aumento na razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, tanto na raiz como na parte aérea sob estresse salino. Mas este aumento é altamente significativo em espécies sensíveis, comparadas a espécies tolerantes. Portanto, esta razão não se apresentou como um parâmetro conclusivo na descriminação da tolerância ao sal entre as duas espécies.

O acúmulo de solutos durante episódios de estresse hídrico resulta numa parcial ou total manutenção do turgor celular (Barlow, 1986). Dos vários osmólitos orgânicos, os açúcares contribuem em cerca de 50% ou mais do  $\psi_s$  total em glicófitas sob salinidade (Ashraf & Harris, 2004), previnem contra a desidratação e são fonte de energia para células ativas sob condições salinas (Elavumoottil *et al.*, 2003).

Inúmeros trabalhos demonstram que sob estresse salino há acréscimo na concentração de açúcares solúveis (Ashraf, 1994; 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).

Ashraf & Harris (2004), compilaram em sua revisão uma série de referências que revelam que não há um padrão no comportamento da sacarose sob estresse salino. Contudo, a sacarose tem sido indicada como a principal molécula de açúcar a atuar no turgor celular (Perry *et al.*, 1987), além de proteger os cloroplastos contra injúrias durante a dessecação (Greenway & Munns, 1980).

Embora a literatura indique uma tendência ao aumento de açúcares sob salinidade, não foram constatadas variações nas concentrações de açúcares totais (raízes e folhas) e sacarose (folhas) de *V. luteola* e *V. unguiculata*.

Dentre as alterações bioquímicas que ocorrem diante da salinidade inclui-se a da síntese protéica (Evers *et al.*, 1997).

Embora Ashraf (1994) não tenha encontrado alterações no teor protéico foliar de linhagens de *Eruca sativa* com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, há trabalhos demonstrando que a concentração de proteínas foliares manteve-se ou aumentou sob salinidade, em plantas mais tolerantes ao sal, mas é afetada em espécies sensíveis (Hajar *et al.*, 1996; Rajesh *et al.*, 1999; Yang & Yen, 2002).

Em folhas de *V. luteola*, o estresse salino não induziu mudanças na concentração de proteínas solúveis, enquanto que em *V. unguiculata* ocorreu uma queda rigorosa sob média e alta salinidade (250mM e 500mM). Em calos de *Brassica olereacea* foi observado comportamento semelhante ao de *V. unguiculata*. Após três semanas de cultivo com NaCl, o teor protéico teve uma queda significativa (Elavumoottil *et al.*, 2003).

A queda da concentração protéica em *V. unguiculata* pode ser devida à alta salinidade, já que o excesso de sais prejudica a síntese protéica e eleva a proteólise (Silveira *et al.*, 2003).

O malondialdeído é um produto da peroxidação de lipídios em plantas expostas à condições ambientais adversas. Ele é um indicador de formação de radicais livres no tecido (Parida *et al.*, 2004) e foi associado recentemente com atuação de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalases, peroxidases e glutationa redutase) que protegem as células de danos oxidativos, entre eles a peroxidação de lipídios, causada por espécies ativas de oxigênio (Meloni *et al.*, 2003; Parida *et al.*, 2004; Vaidyanathan *et al.*, 2003). Assim, as atividades destas enzimas e concentração de malondialdeído são inversamente proporcionais.

O teor de malondialdeído não variou em raízes de V. unguiculata sob estresse salino.

Em folhas de *B. parviflora* a concentração de malondialdeído também manteve-se inalterada em diferentes teores de NaCl (Parida *et al.*, 2004) e Arbona *et al.* (2003), não observaram variação do teor de malondialdeído em citrus sob estresse salino. Contudo, Meloni *et al.* (2003) observaram aumento de malondialdeído em folhas de duas espécies de algodão, sendo que o maior acúmulo deste produto encontrava-se na espécie mais sensível e Vaidyanathan *et al.* (2003) obtiveram resultado semelhante com dois cultivares de *O. sativa*.

É possível que tenha havido danos às membranas celulares de raízes de plantas de *V*. *unguiculata* sob estresse salino, já que a perda de eletrólitos para o meio externo aumentou nesta condição. Este resultado pode ser justificado pela ausência do aumento de atividade das
peroxidases sob salinidade, o que favorece o aumento da formação de espécies ativas de oxigênio e conseqüentemente danos à membrana.

Contudo, a concentração de malondialdeído, que indica a perda de integridade das membranas, manteve-se inalterada sob concentrações crescentes de sal. Este resultado pode ser esclarecido pelo fato da peroxidação lipídica render uma mistura de compostos carbonil, através de uma cadeia de reações, onde o malondialdeído é somente um destes compostos (Kennedy & Filippis, 1999). Assim, a manutenção do teor de malondialdeído, pode estar relacionada com o favorecimento da produção de outros compostos da rota da peroxidação lipídica.

Em *V. luteola* também é provável que tenha havido perda de eletrólitos pela membrana com o aumento da salinidade, embora tenha ocorrido aumento na atividade de peroxidases totais, nestas condições. Como as peroxidases não são as únicas enzimas envolvidas no processo de proteção às membranas contra o ataque de espécies ativas de oxigênio, as atividades de outras enzimas como superóxido dismutase, glutationa redutase, teriam que ser analisadas a fim de se obter um quadro mais claro dos mecanismos envolvidos.

## 6. Conclusões

• Todos os parâmetros de crescimento avaliados demonstraram que *V. luteola* é mais tolerante à alta salinidade que *V. unguiculata*.

• A queda no teor protéico em *V. unguiculata* e a manutenção da concentração de proteínas em *V. luteola*, sob estresse salino, estão relacionadas às diferenças de sensibilidades das espécies nesta condição de cultivo.

• Açúcares solúveis totais e sacarose não estão relacionados com o ajustamento osmótico nas duas espécies de *Vigna*.

• A alta atividade de peroxidases em *V. luteola* é uma característica constitutiva desta espécie e está relacionada à tolerância ao estresse salino.

• A razão  $Na^+/K^+$  não foi um parâmetro eficiente para o estabelecimento da relação entre tolerância e sensibilidade à salinidade, nas espécies estudadas.

## 7. Bibliografia

- 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.
- Alonso, A.; Queiroz, C.S. & Magalhães, A.C., 1997. Chiling stress leads to increased cell membrane rigitidy in roots of coffe (*Coffea arabica* L.) seedlings. Biochem. Biophys. Acta 1323: 75-84.
- Andrade Júnior, A.S.; Santos, A.A.; Sobrinhos, C.A.; Bastos, E.A.; Melo, F.B.; Viana, F.M.P.;
  Freire, F.R.; Carneiro, J.S.; Rocha, M.M.; Cardoso, M.J.; Silva, P.H.S. & Ribeiro,
  V.Q., 2003. Cultivo de Feijão-Caupi. Embrapa. Disponível em:
  www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/feijao/feijao caupi.
- Andreev, I.M., 2001. Functions of the vacuole in higher plant cells. Russ. J. Plant Physiol. 48: 672-680.
- Apel, K. & Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Ann. Rev. Plant Biol. 55: 373-399.
- Apse, M.P. & Blumwald, E., 2002. Engineering salt tolerance in plants. Curr. Opin. In Biotech. 13: 146-150.
- Arbona, V.; Flors, V.; Jacas, J.; García-Agustín, P. & Gómez-Cadenas, A., 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. Plant Cell Physiol. 44: 338-394.
- Asada, K., 1992. Ascorbato peroxidase a hydrogen peroxide-scavening enzyme in plants. Physiol. Plant. 85: 235-241.
- Ashraf, M., 1994. Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*. Biol. Plant. 36: 255-259.

- Ashraf, M., 2002. Salt Tolerance of Cotton: Some New Advances. Crit. Rev. in Plant Sci. 21(1): 1-30.
- Ashraf, M. & Harris, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Sci. 166: 3-16.
- Barlow, E.W.R., 1986. Water relations of expanding leaves. Aust. J. Plant Physiol. 13: 45-58.
- Bataglia, O.C.; Furlani, A.M.C.; Teixeira, J.P.F.; Furlani, P.R. & Gallo, J.R., 1983. Métodos de análise química das plantas. Boletim Técnico do IAC, vol. 78, 78p.
- Bayuelo-Jimenez, J.S.; Debouck, D.G. & Lynch, J.P., 2003. Growth, water relations, and ion composition of Phaseolus species grown under saline conditions. Field Crop Res. 80: 207-222.
- 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, R.L. & Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. Anal. Biochem. 17: 278-293.
- Boerjan, W.; Ralph, J. & Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. Annu. Rev. Plant. Biol. 54: 519-546.
- Borochov-Neori, H. & Borochov, A., 1991. Response of melon plants to salt: 1. Growth, morphology and root membrane properties. J. Plant Physiol., 139: 100-105.
- Bohnert, H.J. & Shen, B., 1999. Transformation and compatible solutes. Sci. Hortic. 78: 237-260.
- Boudet, A.M.; Lapierre, C. & Grima-Pettenati, J., 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. New Phytol. 129: 203-236.

- Boudet, A.M., 2000. Lignins and Lignification: Select issues. Plant Physiol. Biochem. 38: 81-96.
- 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.
- Bray, S. & Reid, D.M. 2002. The effect of salinity and CO<sub>2</sub> enrichment on the growth and anatomy of the second trifoliate leaf of *Phaseolus vulgaris*. Canad J. Bot.-Rev. Canadien. Bot. 80: 349-359.
- Cachorro, P.; Ortiz, A.; Barcelo, A.R. & Cerda, A., 1993. Lignin deposition in vascular tissues of *Phaseolus vulgaris* roots response to salt stress and Ca<sup>2+</sup> ions. Phyton, 33:33-40.
- den Camp, R.G.L. op den; Przybyla, D.; Ochsenbein, C.; Laloi, C.; Kim, C.; Danon, A.; Wagner, D.; Hideg, E.; Göbel, C.; Feussner, I.; Nater, M. & Apel, K., 2003. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. The Plant Cell 15: 2320-2332.
- Chen, G.X. & Asada, K., 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isoenzymes and their differences in enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiol. 30: 987-998.
- Chen, K.; Ha; G.O.; Keutgein, N.; Janssens, M.J.J. & Lenz, F. 1999. The effects of NaCl salinity and CO<sub>2</sub> on pepino (*Solanum muticatum* Ait.) I.Growth and yield. Scientia Horticult. 81: 25-41.
- 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.

- Cram, W.J., 1976. Negative feedback regulation of transport in cells. The maintenance of turgor, volume and nutrient supply. In: Encyclopaedia of Plant Physiology (Luttge, U. & Pittman, M.G. eds.), News Series, Vol. 2, Springer-Verlag, Berlin, pp.284-316.
- Cramer, G.R.; Läuchli, A. & Polito, V.S., 1985. Displacemente of Ca by Na from the plasmalemma of root cells. Plant Physiol. 79:207-211.
- Creelman, R.A.; Mason, H.S.; Bensen, R.J.; Boyer, J.S. & Mullet, J.E., 1990. Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. Plant Physiol. 92: 205-214.
- 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.
- 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.
- Ericsson, T., 1995. Growth and shoot:root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. Plant Soil 168-169: 205-214.
- 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.
- Evers, D.; Schmit, 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: <u>http://www.fao.org/ag/AGL/algl/spush/intro.htm</u>.

- Fernandes de Melo, D.; Jolivet, Y.; Façanhas, A.R., Gomes Filho, E.; Lima, M.S. & Dizengremel, P., 1994. Effect of salt stress on mitochondrial energy metabolism of *Vigna unguiculata* cultivars differing in NaCl tolerance. Plant Physiol. Biochem. 32: 405-412.
- Flowers, T.J.; Troke, P.F. & Yeo, A.R., 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. Annu. Rev. Plant Physiol. 28:89-121.
- Flowers, T.J. & Läuchli, A., 1983. Sodium versus potassium: Substitution and compartmentation. In: Enciclopdia of Plant Physiology, news series, Vol. 15B, Pirson, A. & Zimmemann, M.H. eds., Springer-Verlag, Berlim, 651-681.
- 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. & Hajibaheri, M.A., 2001. Salinity tolerance in Hordeum vulgare: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. Plant Soil 231: 1-9.
- Gaspar, T.; Franck; T. Bisbis; C., Kevers; L. Jouve; Hausman, J.F. & Dommes, J., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regul. 37: 263-285.
- Ghoulam, C.; Foursy, A. & Fares, K., 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustament in five sugar beetr cultivars. Environm. Exp. Bot. 47: 39-50.
- Goldberg, R.; Catesson, A.M. & Czaninski, Y., 1983. Some proprieties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 110S: 267-279.

- Grassi, C.R.B., 2002. Caracterização da resposta fisiológica de plantas cítricas à infecção pelo vírus da tristeza. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Grattan, S.R. & Grieve, C.M., 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. Scien. Hort. 78: 127-157.
- Greenway, H. & Munns, R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31:149-190.
- Haddad, C.R.B. & Mazzafera, P., 1999. Sodium chloride-induced leaf senescence in *Hydrocotyle bonariensis* Lam. and *Foeniculum vulgare* L. Braz. Arc. of Biol. and Tech. 42: 161-168.
- Hajar, A.S.; Zidan, M.A. & Alzahrani, H.S. 1996. Effect of salinity stress on the germination, growth and some physiological activities of black cumin (*Nigella sativa* L). Arab Gulf J. Scient. Resear. 14: 445-454.
- Hajibagheri, M.A.; Harvey, D.M.R. & Flowers, T.J., 1987. Quantitative ion distribution within root cells of salt-sensitive and sat-tolerant maize varieties. New Phyto. 105: 367-379.
- Handel, E.V., 1968. Direct microdetermination of sucrose. Anal. Biochem. 22: 280-283.
- Hasegawa, P.M. & Bressan, R.A., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 463-499.
- Heath, R.L. & Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts I. Kinects and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189-198.
- Helmy, Y.H.; Eabd, S.O.; Aboud-Hadid, A.F.; El-eltagy, M. & El-Beltagy, A.S., 1994.Ethylene production from tomato and cucumber plants under saline conditions.Egyptian J. Hort. 21: 153-160.

- Hernández, J.A.; Ferrer, M.A.; Jiménez, A.; Ros Barceló, A. & Sevilla, F. 2001. Antioxidant systems and O2<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodution in the apoplasto of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. Plant Physiol. 127: 817-831.
- Hiraga, S.; Sasaki, K.; Ito, H.; Ohashi, Y. & Matsui, H., 2001. A Large family of Class III Plant Peroxidases. Plant Cell Physiol. 42: 462-468.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., 1938. The water culture method of growing plants without soil. Berkley, University of California-Agricultural Experiment Station, 39p (Circular 347).
- Hose, E.; Clarkson, D.T.; Steudle, E.; Schreiber, L. & Hartung, W., 2001. The exodermis: a variable apoplastic barrier. J. Exp. Bot., 52:2245-2264.
- Ishikawa, S.I. & Kachi, N. 2000. Differential salt tolerance of two *Artemisia* species growing in contrasting coastal habitats. Ecolog. Res. 15: 241-247.
- Jolivet, Y.; Fernandes de Melo, D.; Silva Limas, M. & Dizengremel, P., 1990. Mitochondrial response induced by salt stress in NaCl-sensitive and NaCl-tolerant cultivars of *Vigna unguiculata*. Physiol. Plant. 79, A70.
- Kawano, T., 2003. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Rep. 21: 829-837.
- Kennedy, B.F. & de Filippis, L.F., 1999. Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. J. Plant Physiol. 155: 746-754.
- Kurban, H.; Saneoka, H.; Nehira, K.; Adilla, R.; & Fujita K., 1998.Effect of salinity on growth and accumulation of organic and inorganic solutes in the leguminous *plants Alhagi psedoalhagi* and *Vigna radiata*. Soil Sci. Plant Nutrition, 44: 589-597.

- Larcher, W., 2000. A planta sob estresse. IN: Ecofisiologia Vegetal (Martins, D.R. & Martins, P.T.), RiMa, São Carlos, pp. 341-354 e 419-433.
- Lee, G.; Carrow, R.N. & Duncan, R.R., 2004. Photosynthetic responses to salinity stress of halophyte seashore paspalum ecotypes. Plant Sci. 166: 1417-1425.
- 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.
- Levitt, J., 1980. Responses of Plant to Environmental Stresses. 2<sup>nd</sup> Edition, Vol. 2, Academic Press. New York. pp. 365-488.
- Lin, C.C. & Kao, C.H., 1999. NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. Plant Soil 206: 147-153.
- Lin, C.C. & Kao, C.H. 2001. Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaClinibited root growth of rice seedlings. Plant Soil 230: 135-143.
- Lutts, S.; Kinet J.M. & Bouharmont, J., 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oriza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Ann. Bot. 78: 389-398.
- Maathuis, F.J.M. & Amtmann, A., 1999. K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> Ratios. Ann. of Bot. 84:123-133.
- Mansour, M.M.F.; Lee-Stadelmann, O.Y. & Stadelmann, E.J., 1993. Salinity stress and cytoplasmic factors. A comparison of cell permeability and lipid partiality in salt sensitive and salt resistant cultivars and lines of Triticum aestivum and Hordeum vulgare. Physol. Plant. 88: 141-148.
- Mansour, M.M.F., 1995. NaCl alteration of plasma membrane of Allium cepa epidermal cells, Alleviation by calcium. J. Plant Physiol. 145: 726-730.

- Mansour, M.M.F. & Salama, K.H.A., 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. Environm. Exp. Bto. 52: 113-122.
- 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.
- McCree, J.K., 1986. Whole-plant carbon balance during osmotic adjustament to drought and salinity stress. Aust. J. Plant Physiol. 13:33-43.
- Meloni, D.A.; Oliva, M.A.; Martinez, C.A. & Cambraia, J., 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. Environm. Exp. Bot. 49: 69-79.
- Minibaeva, F.V. & Gordon, L.K.H., 2003. Superoxide production and the activity of extracelular peroxidase in plant tissues under stress conditions. Russ. J. Plant Physiol. 50: 411-416.
- Mittova, V.; Guy, M.; Tal, M & Volokita, M., 2002. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycorpersicon pennellii* to salt-depent oxidative: increased activities of enzymes in toot plastids. Free Radic. Rep. 36: 195-202.
- Monk, L.S.; Fagerstedt, K.V. & Crawford, R.M.M., 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. Physiolo. Plant. 76: 456-459.
- Moreira, J.L.A. 1997. Estudo taxonômico da sub tribo Phaseolinae Benth. (Leguminosae, Papilionoideae) no sudeste e centro-oeste do Brasil. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, tese de Mestrado.

- Munns, R. & Termaat, A., 1986. Whole-plant responses to salinity. Aust. J. Plant Physiol. 13: 143-160.
- Munns, R.; Schachtman, D.P. & Condon, A.G., 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. Aust. J. Plant Physiol. 22, 561-569.
- 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.M.; Azaize, H. & Leon, D., 1994. Hardening of root cell walls: a growth inhibitory response to salinity stress. Plant Cell Environ. 17: 303-309.
- Neumann, P., 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. Plant Cell and 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.
- Ohta, D; Yasuoka, S.; Matoh, T.; & Takahashi, E., 1989. Sodium stimulates growth of *Amaranthus tricolor* L. Plants through enhanced nitrate assimilation. Plant Physiol. 89: 1102-1105.
- Okusanya, O.T., 1977. Effect of sea water and temperature on germination behavior of *Crithmum maritimumm*. Physiol. Plant. 41: 265-267.
- Okusanya, O.T. & Oyesiku, O., 1994. Comparative salinity tolerance of two legumes, *Vigna luteola* and *Vigna vexillata*, from the coast of Trinidad. Can. J. Bot., 72: 1216-1221.
- O'Leary, J.W., 1995. Adaptative components of salt tolerance IN: Handbook of plant and crop physiology (Pessarakli, M. ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 577-585.
- O'Leary, J.W. & Prisco, J.T., 1970. Response of osmotically stressed plants to growth regulators. Adv. Front. Plant. Sci., 25: 129-139.
- Oliveira, J.B., 2001. Pedologia Aplicada. FUNEP. Jaboticabal.

- Oliveira, I.P. & Carvalho, A.M.A., 1988. A cultura do caupi nas condições de clima e solo dos trópicos úmidos e semi-áridos do Brasil. IN: O caupi no Brasil (Araújo, J.P. & Watt, E.E. eds.), Brasil: IITA/EMBRAPA, pp.65-95.
- Parida, A.K.; Das, A.B. & Mohanty, P., 2004. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes.
  J. Plant. Physiol. 161: 531-542.
- 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.
- Peyrano, G.; Taleisnik, E.; Quiroga, M.; de Forchetti, S.M. & Tigier, H., 1997. Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. Plant Physiol. and Biochem. 35:387-393.
- Phillips, R.D. & McWatters, K.M., 1991. Contribution of cowpeas to nutrition and health. Food Technol. 45: 127-130.
- Prisco J.T., 1980. Alguns aspectos da fisiologia do "stress" salino. Revta. Brasil. Bot. 3: 85-94.
- Queiroz, C.G.S.; Garcia Q.S. & Lemos Filho, J.P., 2002. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membranas em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. Braz. J. Plant Physiol. 14: 59-63.
- Racagni, G.; Pedranzani, H.; Alemano, S.; Taleisni, E.; Abdala, G., Machado-Domenech, E. & 2003/4. Effect of short-term salinity on lipid metabolism and ion accumulation in tomato rotos. Biol. Plant. 47: 373-377.

- Rajesh, A.; Arumugam, R. & Venkatesalu, V. 1999. Responses of *Ceriops roxburghiana* to NaCl stress. Biol. Plant. 42:143-148.
- 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.
- Ros Barceló, A.; Pomar, F. & Pedreño, M.A., 2003. Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevine. Funct. Plant Biol. 30:577-591.
- Rudolph, A.S.; Crowe, J.H. & Crowe, L.M., 1986. Effects of three stabilizing agents-proline, betaine and trehalose-on membrane phospholipids. Arch. Bioch. Biphys. 15: 134-143.
- Saab, I.N.; Sharp, R.E.; Pritchard, J. & Voetberg, G.S., 1990. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. Plant Physiol. 93:1329-1336.
- Sancho, M.A.; de Forchetti, S.M.; Pliego, F.; Valpuesta, V. & Quesada, M.A., 1996. Peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44: 161-167.
- Seeman, J.R. & Critchley, C., 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. Planta 164: 151-162.
- Shannon, M.C., 1992. The effects of salinity on cellular and biochemical processes associated with salt tolerance in tropical plants. IN: Proceedings in plant stress in the tropical environment (T.L. Davenport & H.M. Harrington, eds.), University of Florida, Kailu-Kona, p.56-63.

- Sharma S.K., 1996. Soil salinity effects on transpiration and net photosynthetic rates, stomatal conductance and Na+ and Cl- contents in durum wheat. Biol. Plant. 38: 519-523.
- Shinitzky, M. & Henkart, P., 1978. Fluidity of cell membranes current concepts and trendes. Int. Rev. Cytol. 60: 121-129.
- Silveira, J.A.G.; Viégas, R.A.; Rocha, I.M.A.; Moreira, A.C.O.M.; Moreira, R.A. & Oliveria, J.T.A., 2003. Proline accumulation and glutamine synthase activity are increased by salt-induced protelysis in cashew leaves. J Plant Physiol. 160: 115-123.
- Smirnoff, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessiccation. New Phytol. 125: 27-58.
- Souza, Gustavo Maia, 2001. Contribuição para um conceito sistêmico de estresse em plantas: integração, hierarquia, estabilidade. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, Brasil, tese de Doutorado.
- Souza e Silva, S.M. & Freire Filho, F.R., 1998. Proteínas de Feijão Caupi [*Vigna unguiculata* (L.)]: Caracterização e aplicação nutricional, Embrapa, Teresina, Piauí.
- Steudle, E. & Peterson, C.A., 1998. How does water get through roots? J. Exp. Bot, 49: 775-788.
- Steudle, E., 2000. Water uptake by roots: effects of water deficit. J. Exp. Bot., 51: 1531-1542.
- Subbarao, G.V.; Ito, O.; Berry, W.L. & Wheeler, R.M., 2003. Sodium A Functiional Plant Nutrient. Crit.Rev. in Plant Sci. 22(5):391-416.
- Suhayda, C.G.; Redmann, R.E.; Harvey, B.L. & Cipywnyk, A.L., 1992. Comparative response of cultivated and wild barley species to salinity stress and calcium supply. Crop Sci. 32: 154-163.

- Szabolcs, I., 1994. I. Salt affected soils and the ecosystem for halophytes. IN: Halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands. Squires, V.R. & Ayaoub, A.T., eds., Kluver Academic Publishers, Netherlands, p.19-24.
- Teixeira, S.M.; May, P.H. & Santana, A.C.de, 1988. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: O caupi no Brasil. (de Araújo, J.P.P., Watt, E.E.), International Institute of Tropical Agriculture/Embrapa, Brasília, p99-136.
- Tester, M. & Davenport, R., 2003. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. Ann. Bot. 91: 503-527.
- 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.
- Tsai, Y.C.; Hong, C.Y.; Liu, L.F. & Kao, C.H., 2004. Relative importance of Na+ and Cl- in NaCl-induced antioxidant systems in roots of rice seedlings. Physiol. Plant. 122: 86-94.
- Vaidyanathan, H.; Sivakumar, P.; Chakrabarty, R. & Thomas G., 2003. Scavening of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.)-differential response in salttolerant and sensitive varieties. Plant Sci. 165: 1411-1418.
- Vazquezduhalt, R.; Alcarazmelendez, L. & Greppin, H., 1991. Variation in polar group content in lipids of cowpea (*Vigna radiata*) cell-cultures as a mechanism of haloadaptation. Plant Cell Tissue Org. Cult. 26: 83-88.
- Volkmar, K.M.; Hu Y. & Steppuhn, H., 1998. Physiological responses of plants to salinity: a review. Can. J. Plant Sci., 78: 19-27.

- Wang, D. Wilson; C. & Shannon, M.C. 2002. Interpretation of salinity and irrigation effects on soybean canopy reflectance in visible and near-infrared spectrum domain. Intern. J. Rrem. Sens. 23: 811-824.
- Wei, W.; Bilsborrow, P.E., Hooley, P.; Fincham, 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.
- White, P.J. & Broadley, M.R., 2001. Chloride in Soils an its Uptake and Movement within the Plant: A Review. Ann. Of Bot. 88:967-988.
- Yang, J. & Yen, H.E. 2002. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of ice plant and *Arabidopsis*. A Fourier transform infrared spectroscopy study. Plant Physiol. 130: 1032-1042.
- Yeo, A., 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. J. Exp. Bot. 49: 915-929.
- Young, P.R., 1989. An improved method for the detection of peroxidase-conjugated antibodies on immunoblots. J. Virolog. Meth. 24: 227-236.
- Zayed, M.A. & Zeid. M., 1997/98. Effect of water and salt stress on growth, chlorophyll, mineral ions and organic solutes contents, and enzymes activity in mung bean seedlings. Biol. Plant. 40: 351-356.
- Zenoff, A.M.; Hilal, M.; Galo, M. & Moreno, H.,1994. Changes in roots lipid composition and inhibition of the extrusion of protons during salt stress in two genotypes of soybean resistant or susceptible to stress. Varietal differences. Plant Cell Physiol. 35: 729-735.
- Zhu, J.K., 2001. Plant salt tolerance. Trends in Plant Sci. 6:66-71.