



## SECA E SALINIDADE NA RESPOSTA ANTIOXIDATIVA DE RAÍZES DE FEIJÃO CAUPI

*Josemir Moura Maia<sup>1</sup>, Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo<sup>2</sup>, Joaquim Albenísio Gomes da Silveira<sup>3</sup>, Anselmo Ferreira da Silva<sup>4</sup>, Emannuella Hayanna Alves de Lira<sup>5</sup>, Alberto Soares de Melo<sup>6</sup>, Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses<sup>7</sup>*

### RESUMO

A seca, a salinidade no solo são fatores ambientais que limitam o crescimento vegetal e a produtividade agrícola. No entanto, as plantas se aclimatam a esses estresses abióticos utilizando diversos sistemas de defesa fisiológicos. A comunidade científica vem a cada dia aumentando o interesse pelas respostas fisiológicas das plantas a condições de estresses ambientais, devido ao fato de muitos dos mecanismos utilizados, ainda não serem completamente compreendidos. Uma vez entendidas, as estratégias de reação aos estresses ambientais poderão ser utilizadas como ferramentas nos programas de melhoramento vegetal, para a produção de plantas economicamente importantes, que sejam mais resistentes a esses fatores. Considerando assim o estudo dos mecanismos envolvidos na defesa de plantas, em especial o feijão caupi aos estresses salino e seca, buscou-se reunir nessa revisão informações relevantes que possam nortear o desenvolvimento de pesquisas sobre a defesa bioquímica/metabólica de plantas aos estresses abióticos em questão.

**Palavras-Chave:** estresse oxidativo, tolerância cruzada, *Vigna unguiculata*

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Universidade Estadual da Paraíba – PB, Brasil. [jmouram@uepb.edu.br](mailto:jmouram@uepb.edu.br)

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia da Produção Vegetal – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – RN, Brasil. [cristianemacedo@ufrnet.br](mailto:cristianemacedo@ufrnet.br)

<sup>3</sup>Laboratório do Metabolismo do Estresse em Plantas, Universidade Federal do Ceará – CE, Brasil

<sup>4</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Universidade Estadual da Paraíba – PB, Brasil. [anselmoferreiras@hotmail.com](mailto:anselmoferreiras@hotmail.com)

<sup>5</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Universidade Estadual da Paraíba – PB, Brasil. [emannuellahayanna@gmail.com](mailto:emannuellahayanna@gmail.com)

<sup>6</sup>Departamento de Biologia / Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil. [alberto@uepb.edu.br](mailto:alberto@uepb.edu.br)

<sup>7</sup>Departamento de Biologia / Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil. [chmeneses@gmail.com](mailto:chmeneses@gmail.com)



## ABSTRACT

Drought, salinity in the soil are environmental factors that limit plant growth and crop productivity. However, the plants were acclimated to these abiotic stresses using various physiological defences systems. The scientific community comes every day increasing interest in the physiological responses of plants to environmental stress conditions due to the fact that many of the mechanisms used are not yet fully understood. As understood, the response strategies to environmental stresses can be used as tools in plant breeding programs for the production of economically important plants which are more resistant to these factors. So considering the study of the mechanisms involved in plant defence, especially the cowpea to salt stress and drought, it sought to gather relevant information in this review that can guide the development of research on the biochemical/metabolic defence of plants to abiotic stresses in question.

**Keywords:** oxidative stress, cross-tolerance, cowpea

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas, em seu ambiente natural, estão frequentemente expostas a diversos estresses abióticos como a seca, salinidade e temperaturas extremas. Para as plantas se aclimatarem aos estresses abióticos, elas utilizam diversos sistemas de defesa. Na situação de estresse, as raízes exercem um papel importante sobre a regulação da absorção de água e manutenção do conteúdo hídrico (STEUDLE e PETERSON, 1998). Contudo, os processos regulatórios do fluxo hídrico nas raízes, sobre condições de déficit hídrico, ainda não estão bem entendidos (SIEMENS e ZWIAZEK, 2003).

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

Em glicófitas, os estresses ambientais interferem drasticamente no crescimento e na produtividade (BOYER, 1982, EPSTEIN *et al.*, 1980; YANCEY *et al.*, 1982). Para tanto, os efeitos desses estresses são percebidos em quase todos os principais processos fisiológicos, incluindo a fotossíntese, respiração e fixação e metabolismo do nitrogênio. O feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma glicófito economicamente importante para o nordeste brasileiro (FREIRE-FILHO *et al.*, 2003) por ser amplamente cultivada e consumida, nessa região. Em muitas áreas do território nordestino, pode também ser considerada como uma das principais fontes de proteínas para o homem do campo. A espécie é caracterizada por possuir ampla variabilidade genética, excelente potencial de produção e adaptação (FREIRE-FILHO *et al.*, 2003). O feijão caupi também é considerado uma espécie moderadamente sensível à salinidade (SILVEIRA *et al.*, 1999), embora muito bem adaptado às condições de temperaturas elevadas e de seca ambiental, quando comparado a outras espécies



economicamente importantes (EHLERS e HALL, 1997). Sua relevância pode ser comprovada pela escolha da National Aeronautical and Space Administration (NASA) para ser cultivada e estudada nas estações espaciais. Tal escolha deve-se aos atributos nutricionais superiores da espécie, bem como sua versatilidade, adaptabilidade e produtividade (EHLERS e HALL, 1997).

A seca, a salinidade no solo e temperaturas extremas são fatores ambientais que limitam o crescimento vegetal e a produtividade agrícola (BOYER, 1982). Em resposta a esses estresses, muitas plantas sintetizam e acumulam compostos de massa molecular pequena, assim como açúcares álcoois, prolina e glicina-betaína (HELLEBUST, 1976; YANCEY *et al.*, 1982), os quais são coletivamente referidos como osmólitos, osmoprotetores, ou solutos compatíveis. A função exata desses compostos, nas plantas, embora seja desconhecida, pode estar envolvida na proteção dos vegetais a estresses abióticos, funcionando como uma ferramenta para o ajustamento osmótico celular (HELLEBUST, 1976). Outros estudos indicam que os osmoprotetores proporcionam a preservação da estrutura nativa de proteínas (POLLARD e JONES, 1979). Isso pode ser causado através do retardo na desnaturação térmica de enzimas (PALEG *et al.*, 1981; SMIRNOFF e STEWART, 1985), proteção de proteínas contra a precipitação por polietilenoglicol (PALEG *et al.*, 1984), estabilização de membranas (JOLIVET *et al.*, 1983) e proteção de algumas enzimas contra alguns tipos de desnaturação química. Contrariamente, vários outros pesquisadores inferem, aos osmólitos, papéis não protetores (JOLIVET *et al.*, 1983), onde a estocagem destes produtos, durante o estresse, poderia ser resultante de danos metabólicos induzidos (SMIRNOFF e CUMBES, 1989).

Correntemente, também se assume que um dos principais efeitos negativos dos estresses ambientais é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou a inibição dos sistemas de defesa antioxidativa (ALSCHER *et al.*, 1997; ASADA, 1992). Dentre os ROS, encontra-se o superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila (OH $\cdot$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ). Eles são produzidos nas membranas de muitas organelas de células vegetais, com exceção do  $H_2O_2$ , que é produzido pela superóxido dismutase (SOD) e várias oxidases nos peroxissomas. Os ROS são obtidos normalmente a partir do metabolismo aeróbico e produzidos pela interação entre  $O_2$  com os elétrons que são conduzidos através da cadeia transportadora de elétrons (CTE) nos cloroplastos e mitocôndrias (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).

Um fato importante é que, mesmo os dois estresses comentados aqui (osmótico e oxidativo) poderem exercer respostas diferenciadas nas plantas, eles possuem pontos em comum. Essa situação, pode ser evidenciada pelo fato de que o manitol é frequentemente usado pelos químicos como um eliminador de ROS (SMIRNOFF e CUMBES, 1989), o que permite examinar a capacidade de outros solutos compatíveis em eliminar os ROS. Esse conjunto de moléculas é altamente reativo e, potencialmente, pode danificar as células, em particular através da iniciação da peroxidação de lipídios (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984). Em plantas, os ROS são gerados nos cloroplastos, quando sob alta intensidade luminosa (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).

Em circunstâncias ambientais normais, a concentração de ROS é reduzida, devido à atividade de enzimas protetoras como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase de ascorbato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985; ASADA, 1992). Quando gramíneas encontram-se em situação de estresse hídrico, por exemplo, ocorre aumento na peroxidação de lipídios e acumulação de antioxidantes (PRICE e HENDRY, 1987),



além de aumentar a atividade de enzimas responsáveis pela desintoxicação dos cloroplastos (SMIRNOFF e COLOMBE, 1988). Essas observações, permitem sugerir que ocorre uma elevação nas concentrações de ROS do meio. Vale ressaltar que os solutos compatíveis também são acumulados em plantas sobre situação de deficiência hídrica. Assim, a capacidade dos osmoprotetores de eliminar ROS é também de grande interesse científico (SMIRNOFF e CUMBES, 1989).

Assim, baseado nas assertivas descritas neste item, considera-se relevante o aprofundamento nesse tema. Acredita-se, que o exame das respostas fisiológicas e das alterações metabólicas em plantas, especialmente o feijão caupi, durante situações de estresse fisiológico, pode auxiliar no desenvolvimento de tecnologias, para o estudo mais acurado do aparato metabólico de plantas, sob condições de estresse ambiental.

## 2. INTERAÇÕES ENTRE O AMBIENTE E O ORGANISMO VEGETAL

Os vegetais, durante todo o ciclo de vida, estão sujeitos a uma ampla variedade de adversidades ambientais (HURKMAN e TANAKA, 1987; KNIGHT e KNIGHT, 2001). Essas adversidades, denominadas de estresses, podem ser subdivididas em duas vertentes: os estresses de origem abiótica (seca, temperatura elevada, salinidade, excesso de radiação, frio, etc.); e os estresses de origem biótica (fungos, bactérias, insetos, etc.) (SILVEIRA, 2003). Dentre esses, os estresses abióticos serão enfatizados nesse estudo, como os principais fatores limitantes na produtividade das plantações (EPSTEIN *et al.*, 1980; YANCEY *et al.*, 1982), inclusive da cultura do feijão caupi, no semi-árido nordestino (ARAÚJO e WATT, 1988). Vale ressaltar que a problemática dos estresses abióticos, em vegetais, tornou-se muito relevante nos últimos anos, devido muitos dos mecanismos de tolerância ainda não estarem completamente compreendidos (SHALATA e TAL, 1998; BOHNERT e JENSEN, 1996).

Em glicófitas, os estresses ambientais interferem drasticamente no crescimento e na produtividade das culturas (BOYER, 1982, EPSTEIN *et al.*, 1980; YANCEY *et al.*, 1982). Contudo, os vegetais evoluíram, alcançando o aprimoramento de diversas estratégias bioquímicas e fisiológicas de tolerância/resistência. Essas estimulam as respostas, através de alterações celulares que interferem no metabolismo de tecidos, assim como do organismo como um todo (GREENWAY e MUNNS, 1980; KNIGHT e KNIGHT, 2001; GROVER *et al.*, 1999). Os efeitos dos estresses são notados em quase todos os processos fisiológicos, incluindo a fotossíntese, respiração e na fixação e metabolismo do nitrogênio. Diferentes estádios de desenvolvimento da planta, incluindo a germinação, crescimento da plântula, estágio vegetativo, estágio reprodutivo, maturação da semente e senescência, são diferencialmente afetados em resposta as condições de estresse. Dessa forma, o metabolismo dos carboidratos, gorduras, proteínas e ácidos nucléicos, também, são influenciados sobre exposição dos tecidos ao estresse ambiental (GROVER *et al.*, 1999). Nesse contexto, as raízes são órgãos vegetativos importantes, pois estão na 'linha de frente' dos sinais abióticos, provindos das alterações da constituição do substrato. As raízes exercem o papel principal na regulação da absorção de água e manutenção do conteúdo de água, nos vegetais (SIEMENS e ZWIAZEK, 2003).

## 3. OS ESTRESSES ABIÓTICOS MAIS RELEVANTES AO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

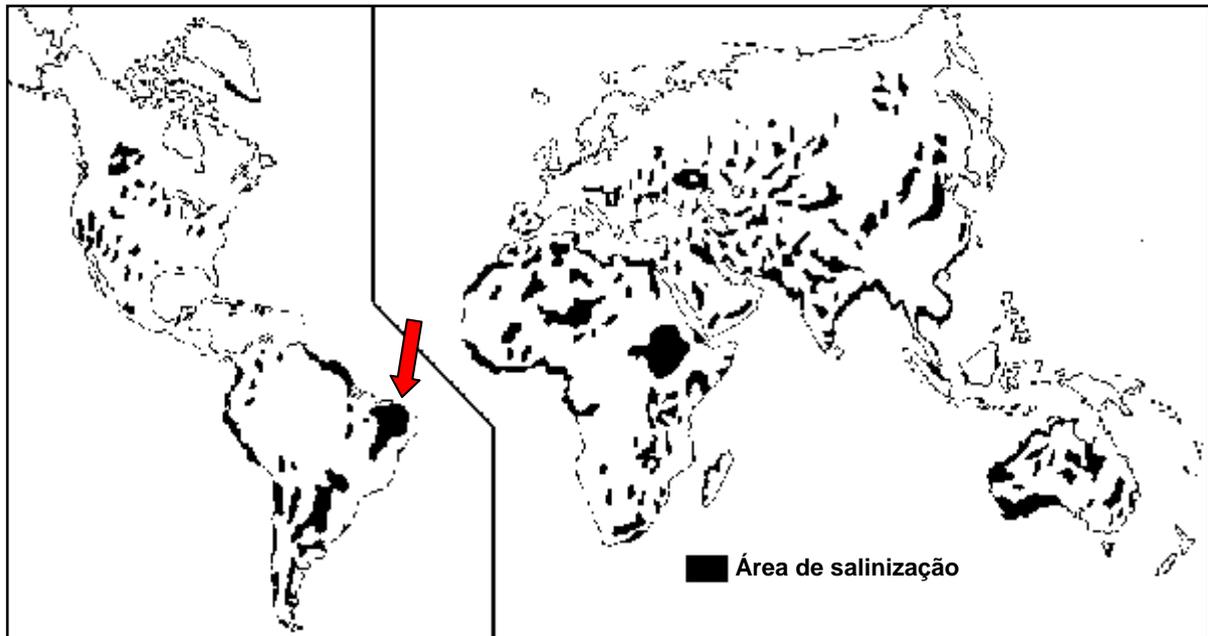


Os estresses abióticos, como a deficiência hídrica, aumento da salinidade do solo e temperaturas extremas são os principais fatores limitantes do crescimento vegetativo e produtividade (EPSTEIN *et al.*, 1980; YANCEY *et al.*, 1982). Dentre estes, a seca e a salinidade são os agentes abióticos estressores mais relevantes e mais estudados pela comunidade científica, o que se comprova pela grande produção literária em torno dessa temática.

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

No nordeste brasileiro, dos 1.600.000 km<sup>2</sup> de terra, cerca de 1.500.000 km<sup>2</sup> são caracterizados como insuficientes em água, constituindo o “polígono das secas” (DANTAS *et al.*, 2002). Nessa região, a irrigação assume papel fundamental no progresso da agricultura. No entanto, a prática de irrigar, aumenta as concentrações de sais na superfície do solo (DANTAS *et al.*, 2002). Como prova, estima-se atualmente que no mundo, 25 % dos solos irrigados estão afetados por diferentes níveis de salinidade (Figura 01) (RHOADES *et al.*, 2003). A incorporação de novas áreas irrigadas, tende a aumentar o problema da salinidade (PEREIRA *et al.*, 1985; SANTOS *et al.*, 1990). Com o agravamento dos problemas de salinização dos solos no Nordeste, em virtude do crescimento da área utilizada com culturas irrigadas, o sucesso da atividade agrícola pode ser alcançado através de práticas de manejo do solo que sejam capazes de reduzir a salinidade no solo, ou de selecionar genótipos tolerantes ao estresse salino. Como o primeiro procedimento é dispendioso, demorado e, às vezes, impraticável, a segunda opção apresenta-se muito promissora (DANTAS *et al.*, 2002).

Contudo, as formas de estresses abióticos supracitados, geram diversas conseqüências, causadas tanto pelo agente propriamente dito (por exemplo, a toxicidade iônica e estresse osmótico – promovido pelo estresse salino), como por efeitos indiretos da ação desses estresses. Para facilitar a compreensão serão denominados de estresses primários, os causados diretamente pelos agentes estressores e como estresses secundários, os causados pelos efeitos indiretos. Mais detalhes ainda serão descritos.



**Figura 01** – As áreas escuras, representam as terras afetadas por salinidade pelo uso de águas salinas na irrigação (adaptado de RHOADES *et al.*, 2003). No Brasil uma das áreas mais afetadas pela salinização é o nordeste (indicado pela seta vermelha).

#### 4. ESTRESSE SALINO E SECA

A água é o componente mais importante para a vida, podendo constituir até 90 % da massa fresca de vegetais, atuando em praticamente todos os processos fisiológicos e bioquímicos, como solvente, por meio do qual, gases, minerais e outros solutos entram nas células e são deslocados pela planta. Possui ainda, papel importante na regulação térmica do vegetal, agindo tanto no resfriamento como na manutenção e distribuição de calor (NEUMAIER e NEPOMUCENO, 1994). Nas plantas, as raízes exercem o papel de responsáveis pela regulação da absorção de água e manutenção do conteúdo hídrico do vegetal (SIEMENS e ZWIAZEK, 2003). Para estudos focados nas raízes, os estresses ambientais mais importantes, são aqueles que exercem seus efeitos no conteúdo de água do vegetal (BOHNERT *et al.*, 1995). Dentre eles, a deficiência hídrica é um dos mais relevantes, podendo se originado através de diversos fatores abióticos, como a seca, salinidade e temperaturas extremas (ROMO *et al.*, 2001; KUZNETSOV, 1999). Contudo, os mecanismos de regulação do fluxo hídrico, na planta, em condições de déficit hídrico, não estão bem entendidos (SIEMENS e ZWIAZEK, 2003).

Atualmente sabe-se que os efeitos da seca na produção provocam alterações no metabolismo e crescimento. Sua intensidade é diretamente dependente do estágio fisiológico em que o organismo se encontra e da sua severidade. Em soja, por exemplo, nas fases de germinação e emergência, diminui o estande das plantas. No florescimento, causa o aborto das flores e impede a antese, enquanto que durante o enchimento dos grãos, pode afetar o ganho de massa e, conseqüentemente a produção (BERLATO, 1981; FAGERIA, 1989). O processo de crescimento celular, através da síntese de proteínas e de parede celular, é o mais sensível às reduções na disponibilidade de água dos tecidos



(SALISBURY e ROSS, 1992; NOBEL, 1992). Siemens e Zwiazek (2003) afirmam que a seca pode também inibir o crescimento radicular, além de alterar a estrutura da raiz, bem como aumentar sua suberização. Entretanto, os mecanismos moleculares que respondem às reduções no potencial de água e que desencadeiam os processos responsáveis pela paralisação do alongamento celular, ainda não estão bem entendidos. Acredita-se que, tais processos, são mediados pelo ácido abscísico (ABA), o qual é encontrado em grande quantidade, durante o estresse (BRAY, 1993; INGRAM e BARTELS, 1996). Adicionalmente, várias espécies vegetais exibem aumento nas concentrações de substâncias nitrogenadas como prolina, betaínas, citrulinas (RABE, 1993), além de sacarose e açúcares-álcoois, como o pinitol (INGRAM e BARTELS, 1996), utilizando-os como estratégia para ajustamento osmótico e prevenção da perda de água e subsequente desidratação celular (HANDA *et al.*, 1986).

A falta de água também pode afetar a eficiência dos processos fotossintéticos, tanto de forma direta, através da desidratação do citoplasma, como indiretamente, devido ao fechamento estomático (MIYASAKA e MEDINA, 1981; KELES e ÖNCEL, 2002). Uma consequência das limitações fotossintéticas, induzidas pela seca, é a exposição das plantas a excessos de energia. Esta, quando não satisfatoriamente dissipada, pode prejudicar o fotossistema II (PSII), devido à super-redução dos centros de reação e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio no cloroplasto (LOGGINI *et al.*, 1999). Apesar de anos de pesquisa sobre o estudo do déficit hídrico em plantas superiores, os processos moleculares que são mais rapidamente afetados, como também os mecanismos iniciais da resposta molecular, ainda não estão bem compreendidos (BRAY, 1993).

O excesso de sais no solo também pode diminuir a disponibilidade de água para o vegetal. Em adição ao estresse iônico, também causa estresse osmótico, como ocorre na situação de seca. Concentrações elevadas de sais no solo reduzem o potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) do meio, reduzindo a disponibilidade de água (ZHU, 2001b; WINICOV, 1998). Esses dois estresses, de forma muito semelhante ao estresse por deficiência hídrica, causam danos fisiológicos ou provocam estresses secundários como a oxidação. Cada estresse, primário ou secundário, originado a partir da exposição ao sal, ou deficiência hídrica, possui sua própria cascata de sinalização, via metabólica e estratégia de adaptação e tolerância (ZHU, 2001a). Entretanto, o grau de interdependência dessas vias existe, mas ainda não está totalmente esclarecido (ROUT e SHAW, 2001). Um fato importante é que o processo de salinização pode ser originado de causas naturais ou artificiais.

Áreas da superfície terrestre que são consideradas salinas são aquelas que se encontravam ou se encontram inundadas por águas salinas (áreas de manguezais nas costas tropicais e subtropicais), desertos salinos e pequenas áreas próximas a depósitos de sais (CHAPMAN, 1975; CARDOSO, 2000). A relação entre infiltração e evaporação também aumenta a salinização dos solos. Se a infiltração for maior, os solos são lixiviados e conseqüentemente, se acidificam. Se a evaporação predomina, ocorre o contrário, acumulando sais na superfície do solo e, com facilidade, estes se salinizam.

O homem também pode ser responsável pela salinização, quando utiliza inadequadamente os sistemas de irrigação. Assim, observa-se que podem existir várias causas para a salinização, decorrentes de irrigação artificial mal conduzida, como: exploração irracional dos recursos hídricos; destruição da vegetação nativa; ausência de drenagem adequada, para evitar a ressuspensão de sais; camada superficial do solo



compactada, após perda de matéria orgânica; utilização de água de baixa qualidade para irrigação e etc. (PRIMAVESI, 1987).

Como visto, para salinizar um solo, não é preciso que a água do subsolo seja salina, muito menos que haja temperaturas ambientais elevadas, pois mesmo a “água doce” contém sais. Nas zonas áridas, por exemplo, a água do subsolo sobe e evapora, ou é absorvida pelas plantas; dessa forma, o movimento descendente é mínimo. O excesso de sais é depositado na camada superficial do solo, tornando-o salino (PRIMAVESI, 1987). Dentre os íons mais envolvidos no processo de salinização, podemos citar:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  e  $\text{HCO}_3^-$  (OLIVEIRA, 1997).

A salinidade também interfere nas concentrações de potássio ( $\text{K}^+$ ) encontradas nas plantas, um componente essencial para o ajustamento osmótico celular, principalmente para o fenômeno de abertura e fechamento estomático (MAATHUIS e AMTMANN, 1999). De acordo com Serrano e Rodriguez-Navarro (2001), durante o estresse salino ocorre um decréscimo na absorção de potássio ( $\text{K}^+$ ) e um aumento no influxo de sódio ( $\text{Na}^+$ ). Como o  $\text{Na}^+$  é tóxico (AMZALLAG *et al.* 1990) e o  $\text{K}^+$  é o soluto que mais contribui para a manutenção da pressão osmótica e da força iônica, as plantas estressadas por NaCl ativam transportadores de cátions no tonoplasto e na membrana celular, para manter sua homeostase. A maioria dos trabalhos sobre o metabolismo de  $\text{Na}^+$  em plantas são baseados nas características de adaptação, fornecidas por dois modelos: a planta *Arabidopsis thaliana* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A partir desses modelos são observados importantes aspectos na síntese de osmólitos, transporte de água, estabilização de membranas e proteínas, controle redox e remoção de ROS (SERRANO e RODRIGUEZ-NAVARRO, 2001).

O efeito tóxico sobre o metabolismo celular e fisiológico, pelo acúmulo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nos tecidos e a redução na disponibilidade de água, causada pela diminuição do potencial hídrico do solo, pode explicar danos fisiológicos como a redução do crescimento de plantas, quando submetidas à salinidade. A queda no potencial hídrico do solo explica a redução da transpiração e da assimilação de fotossintatos. A turgescência da parte aérea também é afetada, impedindo a expansão de folhas mais jovens. Muitos autores acreditam que a turgescência é a principal força que impele a expansão celular nos tecidos em crescimento. Em situações de estresse salino, a expansão foliar decresce com a limitação da disponibilidade de água (AMZALLAG, 1997; ZHU, 2001b).

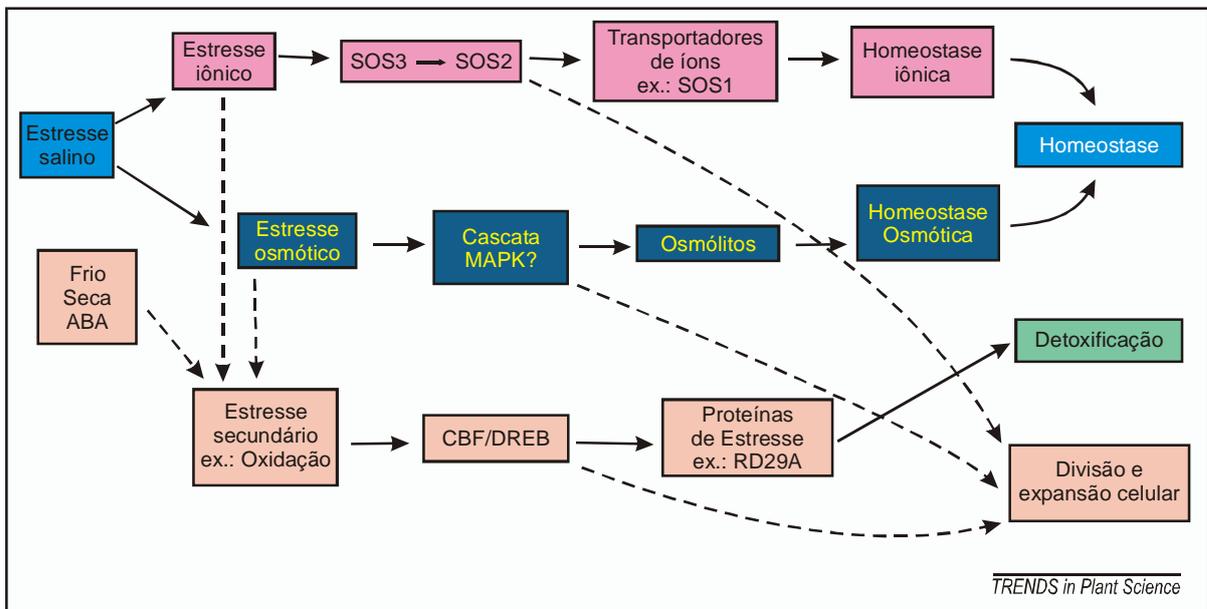
Neste contexto, muitos dos estudos realizados sobre a sinalização do estresse hídrico focalizam o estresse salino, devido às respostas ao sal e à seca, serem intrinsecamente relacionadas e os mecanismos de resposta e sinalização, sobrepostos. Por um ponto de vista prático, o estresse salino pode ser imposto com mais facilidade e precisão em experimentos de laboratório (ZHU, 2002).

#### 4.1. Respostas fisiológicas e celulares ao estresse salino e à seca

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

fechamento estomático, expressão de genes e modificações em processos celulares e moleculares. Conforme a Figura 02, as vias que conduzem os estímulos da seca e do estresse salino são interconectadas pelos estresses primários e pelas respostas conferidas (homeostase, desintoxicação e controle do crescimento). Dentre as vias de sinalização, destaca-se a via SOS como mediadora da homeostase iônica e tolerância ao  $\text{Na}^+$ ; a cascata de proteínas quinases (MAPK) mediadora da homeostase osmótica; e a cascata de proteínas do tipo LEA (*'late embryogenesis activated'*), responsáveis pelas vias que promovem a desintoxicação ou alívio dos danos oxidativos.

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



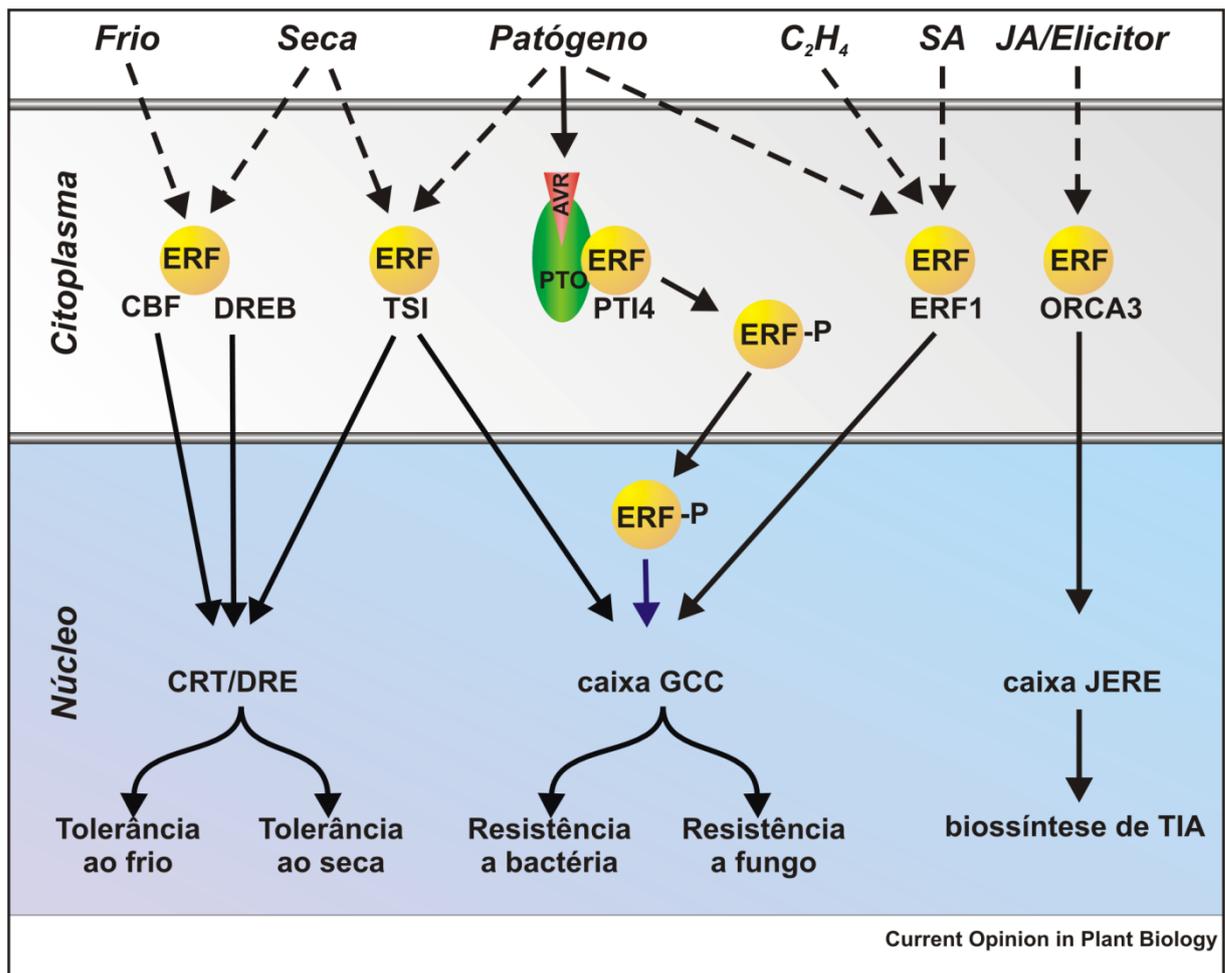
**Figura 02** – Os três aspectos da tolerância ao sal em plantas (homeostase, desintoxicação e controle do crescimento) e as vias que os interconectam; a homeostase é dividida em homeostase osmótica e iônica. A via SOS media homeostase iônica e tolerância ao  $\text{Na}^+$ . Uma cascata de proteínas quinases (MAPK) ativada por mitogênese, similar a via HOG1 em levedura, media a homeostase osmótica. Os dois estresses primários, iônico e osmótico, causam danos ou estresses secundários assim como a oxidação. Proteínas do tipo LEA induzidas por estresse assim como as RD29A promovem desintoxicação e aliviam danos. Fatores de transcrição do tipo CBF/DREB mediam algumas das expressões gênicas para a síntese de proteínas em resposta a estresses secundários, causados pelas altas concentrações de sais, frio, seca, ou ácido abscísico (ABA). A homeostase iônica, homeostase osmótica e vias de desintoxicação sustentam ativamente a divisão e expansão celular (adaptado de Zhu, 2001b).

#### 4.2. Tolerância cruzada

Para sobreviver, as plantas utilizam vias e componentes comuns durante a resposta a vários tipos de estresses diferentes (PASTORI e FOYER, 2002). Este fenômeno, conhecido como tolerância cruzada, permite à planta se adaptar/aclimatar a uma gama de estresses, após exposição a um único estresse específico (PASTORI e FOYER, 2002).

Vale ressaltar que, aos mecanismos utilizados para responder os estresses ambientais, sob estas circunstâncias, é dado o nome de resposta cruzada (KNIGHT e KNIGHT, 2001). As respostas cruzadas ocorrem quando duas ou mais vias de sinalização, de estressores diferentes, convergem para um mesmo ponto, ou em vias de sinalização que interagem, interferindo nas respostas, uma das outras, para atingir objetivos diferentes, como exemplificado na Figura 03. No exemplo, as vias de sinalização de diversos estresses utilizam componentes comuns das vias de sinalização do etileno. As respostas cruzadas, também podem ocorrer entre vias, em diferentes órgãos da planta. Nessa situação, um sinal sistêmico, assim como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e outros sinalizadores, se deslocam de uma célula estimulada para outro tecido (KNIGHT e KNIGHT, 2001).

No caso da tolerância à seca e à salinidade, elas também podem ser obtidas através da manutenção, ativação ou promoção de sistemas fisiológicos comuns. Zhu (2002) propõe que, para sobreviver sob condições de estresse salino ou seca, o organismo vegetal utiliza três processos: (a) homeostase, que inclui a homeostase iônica, relevante principalmente durante o estresse salino, e homeostase osmótica ou ajustamento osmótico; (b) controle dos danos e reparo, ou desintoxicação; e (c) controle do crescimento.



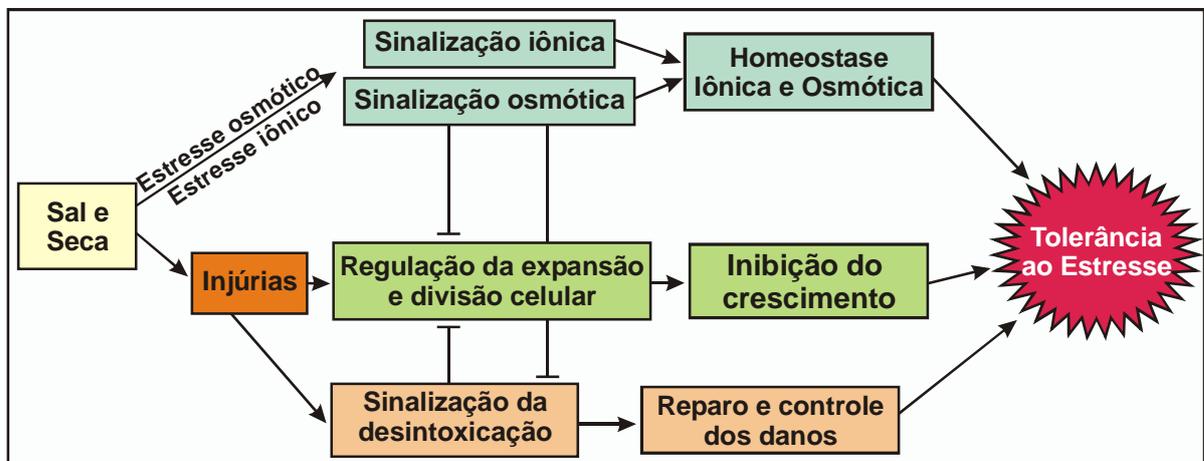
**Figura 03** – Resumo de algumas das respostas de estresse e ou sinais ligados a fatores de transcrição ERF (fatores de resposta ao etileno). A figura também mostra que diferentes estresses ou moléculas elicitoras,

como ABA, ácido jasmônico e etileno podem ativar os mesmo fatores de transcrição e gerar respostas a níveis de expressão gênica, que conferem aclimatação a outros estresses abióticos (adaptado de SINGH *et al.*, 2002).

Assim, a sinalização durante os estresses salino e seca pode ser subdividida em três categorias funcionais: (a) sinalização do estresse iônico e osmótico para o restabelecimento da homeostase celular, sob condições de estresse; (b) sinalização da desintoxicação para controle e reparo dos danos causados pelos estresses; e (c) sinalização para coordenar a expansão e divisão celular (Figura 04) (ZHU, 2002).

### 4.3. Ajustamento osmótico

O ajustamento osmótico é considerado um componente importante na tolerância à seca e à salinidade em plantas. Quando submetidas a diferentes estresses ambientais, as plantas acumulam solutos orgânicos de baixo peso molecular, habitualmente denominados de solutos compatíveis, os quais incluem aminoácidos, betaínas e açúcares (BAJJI *et al.*, 2001). Glicófitas (como o feijão caupi) expostas a um ambiente salino, por exemplo, provocam muitas modificações em sua fisiologia e, embora o crescimento das glicófitas, sob estas condições, seja reduzido, a absorção de macro e micronutrientes não são sempre inibidas o que é verificado pelo aumento da absorção de  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $HPO_4^{-2}$ ,  $NO_3^-$  e microelementos, após exposição ao sal, como explica Alam (1994).



**Figura 04** – Demarcação funcional das vias de sinalização do estresse salino e seca. A ativação das vias de sinalização iônica e osmótica ocorre com alterações iônicas (excesso de  $Na^+$ ) e osmóticas (por exemplo, turgescência) no meio. O final da sinalização é a homeostase celular. Os sinais que promovem a desintoxicação são estresses secundários (injeções). A cascata de sinalização culmina no reparo e controle dos danos (por exemplo, ativação de genes responsáveis pela tolerância à dessecação). Interação entre homeostase, regulação de crescimento, e vias de desintoxicação também são indicadas (adaptado de ZHU, 2002).

No entanto, a restrição da absorção de  $Cl^-$  e  $Na^+$  pelas raízes, caules e folhas, durante estresse salino é um mecanismo importante de tolerância em glicófitas (WAHOME *et al.*, 2001), as quais são sensíveis às altas concentrações de  $Na^+$ , principalmente devido à baixa atividade antiporte  $Na^+/H^+$  (GRUWEL *et al.*, 2001). Interessantemente, ao contrário das glicófitas, que são injuriadas com o decréscimo do



potencial hídrico e acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (tóxicos) no citosol, as halófitas não sofrem tanto os efeitos deletérios causados pela alta concentração de  $\text{NaCl}$  devido a um avançado sistema transportador de íons. As halófitas utilizam a absorção controlada de  $\text{Na}^+$ , para o interior dos vacúolos, como estratégia fisiológica na absorção de água, em um ambiente externo com potencial hídrico reduzido (GRUWEL *et al.* 2001). Acredita-se, portanto, que o ajustamento osmótico permite às plantas manterem a turgescência celular compatível ao crescimento. Dessa forma, os solutos orgânicos contribuem para o balanço osmótico intracelular e proteção de enzimas citoplasmáticas, quando as concentrações de íons nos vacúolos são elevadas (CARDOSO, 2000).

Apesar de *V. unguiculata* ser considerada uma espécie com capacidade de ajustamento osmótico limitado (MCCREE e RICHARDSON, 1987), Cardoso (2000), afirmou que, em condições de estresse hídrico, essa espécie aumenta até trinta vezes a concentração de prolina (osmólito) nas raízes. Esse aumento é considerado rápido, assim como o decréscimo após a reidratação dos tecidos (COSTA, 1999). Com base nessa idéia, é que foi proposto que esse aminoácido pode participar do ajustamento osmótico de plantas de feijão caupi, quando submetidas ao estresse hídrico. Entretanto, a efetividade da prolina, como um agente que pode conferir tolerância diferencial a essa espécie, é uma questão que ainda permanece em aberto, inclusive durante condições de estresse salino (SILVEIRA *et al.*, 1999).

Prolina é o aminoácido mais acumulado, na maioria das espécies (ASPINALL e PALEG, 1981). Algumas apresentam acúmulo de prolina nas folhas na ordem de até 100 vezes durante a resposta ao estresse hídrico (LEA, 1997). Entretanto, poucos trabalhos mostram a variação na concentração desse aminoácido em raízes (ASPINALL e PALEG, 1981).

Trabalhos que relacionam a tolerância ao estresse e os osmólitos orgânicos, mostram que esses solutos também podem agir como agentes desintoxicadores que reduzem os níveis de ROS citoplasmáticos (ZHU, 2001b; BARTELS, 2001; HAMILTON e HECKATHORN, 2001). Assim, ZHU (2001b) acredita que, a produção localizada desses osmólitos, nos cloroplastos (fontes de produção de ROS), a partir de uma sequência sinalizadora, resultaria em uma maior proteção local.

#### 4.4. Alteração no padrão protéico

Estudos das respostas moleculares ao déficit hídrico revelam mudanças na expressão gênica. Um grande número de genes, induzidos por estresse, já foram identificados. Genes induzidos pela seca codificam proteínas que exercem papéis importantes nas respostas ao estresse hídrico, promovendo a formação de proteínas, que conferem tolerância à desidratação, protegendo estruturas celulares ou se envolvendo nas vias de transdução de sinais, permitindo a indução de genes sobre condições de estresse. Contudo, a função de várias proteínas induzidas por estresse, tais como desidrinas, LEAs (abundantes após embriogênese), LTPs (proteínas de transferência de lipídios) e RABs (resposta ao ácido abscísico), permanece desconhecida (ROMO *et al.*, 2001).

Outras proteínas que têm sua concentração influenciada durante a situação de estresse são as aquaporinas. Segundo Kjellbom *et al.* (1999), as aquaporinas são proteínas que facilitam o movimento passivo de moléculas de água através da membrana, acompanhando o gradiente de potencial osmótico. Em plantas, as



aquaporinas são geralmente encontradas na plasmalema e no tonoplasto. Segundo o mesmo autor, a expressão de algumas aquaporinas é regulada pela seca. O estresse salino também pode estimular a síntese de algumas proteínas. Como exemplo, em situação de estresse iônico, a produção de diversos tipos de ATPase que mobilizam o  $\text{Na}^+$  para fora da célula, ou para dentro do vacúolo, pode ser estimulada (MANSOUR *et al.*, 2003, APSE, 1999).

É sabido, que a síntese protéica é fortemente influenciada pelo déficit hídrico (BRADFORD e HSIAO, 1982). Simultaneamente à diminuição na síntese protéica, há o aumento no 'turnover' de proteínas, através do aumento da atividade de proteases, o que aumenta a concentração intracelular de aminoácidos livres (RABE, 1993).

#### 4.5. Respostas a estresses secundários

A mais importante e melhor documentada resposta das plantas aos estresses abióticos e bióticos, como o calor, frio, alta intensidade luminosa, seca, choque osmótico, embebição, radiação UV-B, ozônio e patógenos, é a produção acelerada de ROS (PASTORI e FOYER, 2002).

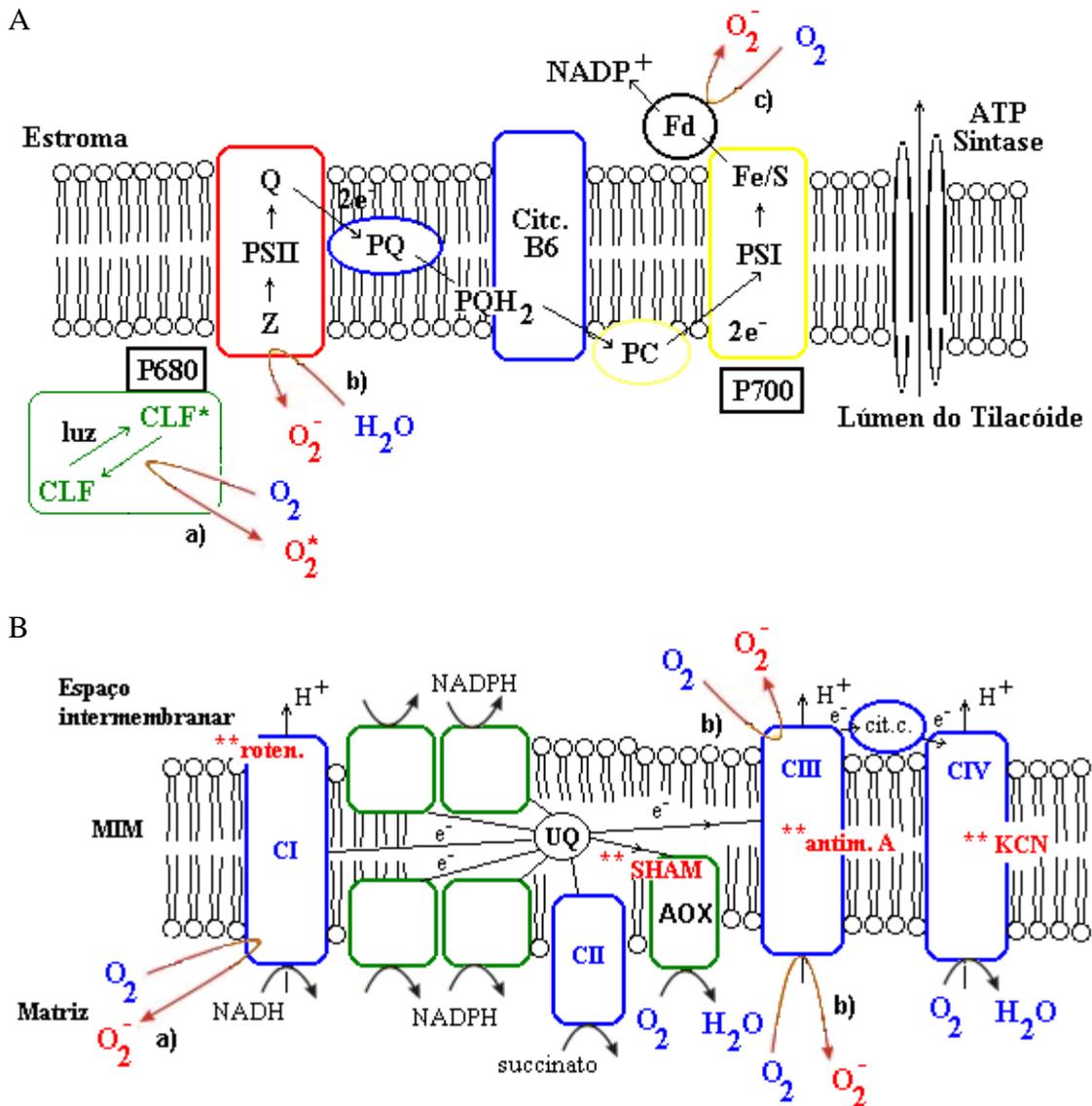
Plantas tolerantes à salinidade e à seca, além de serem capazes de regular o movimento da água e dos íons na condição de estresse, possuem também um eficiente sistema de defesa contra o estresse oxidativo. Para tanto, enzimas antioxidantes são os principais componentes dos sistemas antioxidativos de plantas, sendo, portanto, largamente responsáveis pela remoção de ROS (HOEKSTRA *et al.*, 2001). O papel das enzimas antioxidantes, como mecanismo principal de resposta a diferentes estresses ambientais, será enfatizado adiante.

### 5. ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de ROS é uma das principais respostas bioquímicas das células eucarióticas a estresses bióticos e abióticos. Os cloroplastos (HERNÁNDEZ *et al.*, 1995) e mitocôndrias (HERNÁNDEZ *et al.*, 1993) das células vegetais são os principais geradores de ROS, onde, através de suas cadeias transportadoras, os elétrons podem reagir com o  $\text{O}_2$ , durante o metabolismo aeróbico normal, como também, sob condição de estresse salino e seca, produzindo espécies ativas de oxigênio (Figura 05). Essas espécies de oxigênio ativado são altamente reativas e, na ausência de qualquer mecanismo protetor, podem desorganizar seriamente o metabolismo (DIONISIO-SESE e TOBITA, 1998).

Se analisarmos antropomorficamente, para se livrar dos danos causados pelos ROS a célula poderia muito bem conduzi-los ao vacúolo, obedecendo a uma estratégia de escape imediato. Entretanto, a notável permeabilidade dos ROS às membranas, impossibilita a compartimentalização (MCKERSIE, 1996). Por esta razão as células vegetais adotam, como sistema de defesa, um aparato metabólico de substâncias e enzimas antioxidantes tais como as dismutases de superóxido (SOD – EC 1.15.1.1), que metaboliza o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ); as catalases (CAT – EC 1.11.1.6.), uma variedade de peroxidases, que removem o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (SCANDALIOS, 1993; JIMÉNEZ *et al.*, 1997; DEL RIO *et al.*, 1998; BREUSEGEM *et al.*, 2001), além de diversos antioxidantes não enzimáticos como ácido ascórbico, glutatona e  $\alpha$ -tocoferol (SELOTE *et al.*, 2004; KELES e ÖNCEL, 2002).

Assim, como as SODs, CATs e as POXs são importantes enzimas do sistema de defesa das plantas contra ROS, o aumento da atividade dessas, pode ser considerado uma evidência circunstancial da produção de ROS (CAKMAK e HORST, 1991) e o que é mais importante, da tentativa da planta em evitar os danos oxidativos promovidos por eles.



**Figura 05** – Sítios de produção de ROS no cloroplasto [A]. a) O oxigênio ativado pode ser convertido a partir de seu estado primário na clorofila, durante a coleta de energia luminosa. b)  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  podem ser formados no lado oxidante da PSII. c) Oxigênio em seu estado primário pode ser reduzido a  $O_2^-$  pela ferredoxina presente no lado redutor da PSI. Sítios de produção de ROS na mitocôndria [B]. A produção de ROS na mitocôndria compreende dois sítios principais; a) o complexo respiratório I e b) o complexo respiratório III. Desde que a ubiquinona ( $UQH_2$ ) reduzida esteja limitada pelas superfícies interna e externa da membrana mitocondrial interna (MIM), ROS podem ser formados em ambos os lados da membrana (CIII). Em vermelho (\*\*) os inibidores das proteínas respiratórias (adaptados de Cavalcanti, 2002).



### 5.1. Espécies reativas de oxigênio

Um dos grandes paradoxos da realização da vida reside no fato da molécula que sustenta a bioquímica dos seres aeróbicos, o oxigênio, não ser apenas fundamentalmente essencial para o metabolismo energético e respiração, mas também, causa de muitas doenças e condições degenerativas (MARX, 1985; SCANDALIOS, 1993). Em humanos, são conhecidos exemplos de desordens metabólicas que envolvem formas ativas de oxigênio, tais como câncer, artrite e disfunções nervosas. Essas formas de oxigênio, também são responsáveis por disfunções em plantas cultivadas, onde sua produção é induzida por estresses bióticos e abióticos (MAXWELL *et al.*, 1999). Contudo, estudos de detecção e monitoramento de ROS são recentes. Esse fato é devido, em parte, à grande dificuldade de detecção e monitoramento dessas moléculas, seja pela variedade de intermediários e formas que o oxigênio pode assumir, seja pela elevada taxa de reatividade química, envolvida nas reações. Como consequência, freqüentemente adota-se, a título experimental, o acompanhamento de sinalizadores moleculares de reações oxigenadas a fim de determinar a relação causa/efeito nas respostas ao estresse (MCKERSIE, 1996).

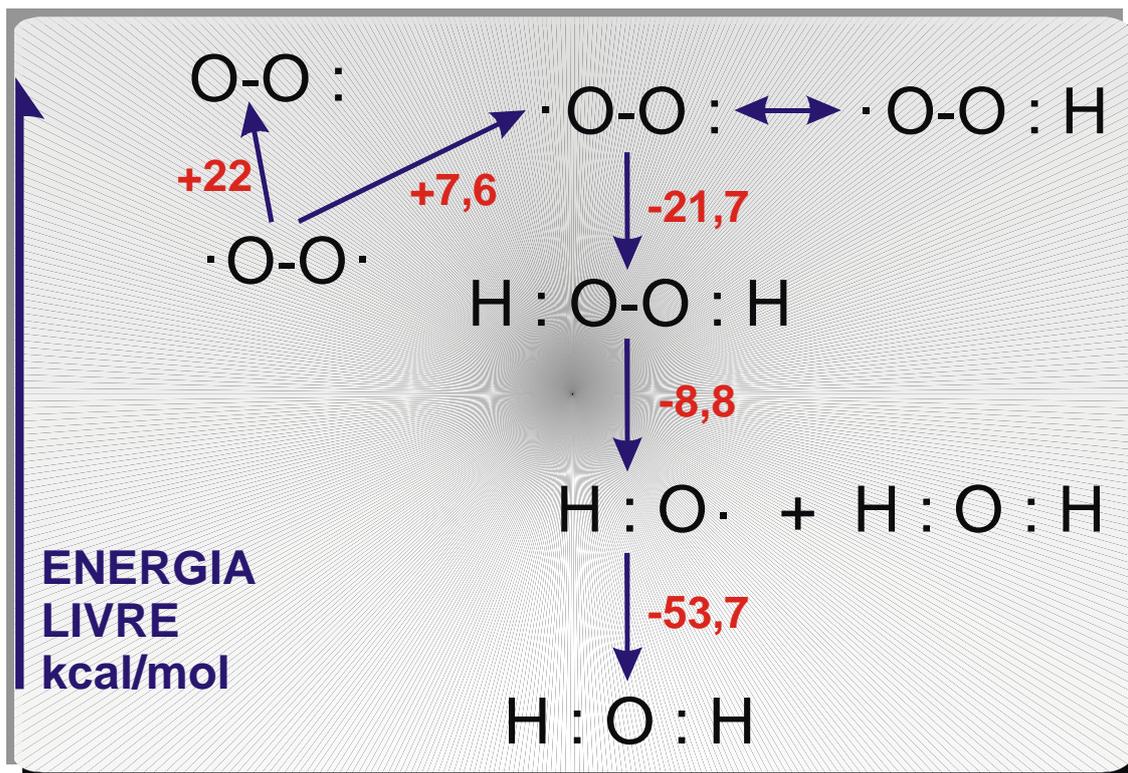
Na fisiologia da planta, vários processos metabólicos fazem uso de ROS como forma benéfica. Como exemplo, pode ser citado o envolvimento de  $H_2O_2$  e  $O_2^-$  na formação de lignina da parede celular. Outro exemplo é observado sobre infecção de plantas com patógenos, ou sobre tratamento com elicitores, quando há o aumento exagerado das espécies ativas de oxigênio. Esta explosão oxidativa é responsável pela morte celular, nas respostas de hipersensibilidade e na rápida formação de proteínas ricas em hidroxiprolina, associadas à defesa contra patógenos (INZÉ e VAN MONTAGU, 1995).

A redução do oxigênio à forma de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila é o mecanismo principal de ativação do oxigênio, na maioria dos sistemas biológicos. Contudo, em plantas fotossintéticas, a formação de oxigênio ativo, pelos fotossistemas, tem importância fundamental. O oxigênio ativado é freqüentemente produzido como um dos componentes do metabolismo, que permite reações químicas complexas, como a polimerização da lignina (SCANDALIOS, 1993; PEIXOTO, 1998; DIONISIO-SESE e TOBITA, 1998; DATTA e MUTHUKRISHNAN, 1999). No entanto, em outras situações, o oxigênio ativado é produzido por meio de distúrbios enzimáticos ou em sistemas de transporte de elétrons, como resultado de perturbações no metabolismo causadas por estresse químico ou ambiental (ZHU, 2001b).

Um das formas mais instáveis, porém uma das mais reativas é o radical superóxido ( $O_2^-$ ) (Figura 06). Este pode agir como oxidante ou como redutor, podendo oxidar enxofre, ácido ascórbico ou NADPH, além de ser capaz de reduzir o citocromo *c* e íons metálicos. Para ser eliminado, ocorre uma reação de dismutação no radical, que leva à formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), o que pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisado pela enzima dismutase de superóxido (GRANT e LOAKE, 2000; BREUSEGEM *et al.*, 2001; FOYER e NOCTOR, 2000). Vale ressaltar, que o peróxido de hidrogênio não pode ser considerado um radical livre, devido a todos seus elétrons estarem emparelhados.

## 5.2. Sítios celulares de produção e eliminação dos ROS

Existem muitas fontes moleculares de produção de ROS nas plantas (Tabela 01). Algumas delas são reações envolvidas no metabolismo normal, assim como a fotossíntese e respiração. Outras são vias que aumentam sua atividade, durante os estresses abióticos, como a via que utiliza a enzima glicolato oxidase nos peroxissomas, durante a fotorrespiração. Contudo, novas fontes metabólicas que produzem ROS foram identificadas em plantas. Isso inclui as reações catalisadas por NADPH oxidases, amino-oxidases e peroxidases ligadas à parede celular (MITTLER, 2002). Em situações de estresses abióticos, como o estresse salino e a seca, a produção de ROS é resultante principalmente da fotorrespiração, do aparato fotossintético, da respiração mitocondrial e em menor proporção, das reações da NADPH oxidase (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996).



**Figura 06** – Os estados de ativação de oxigênio. O oxigênio não ativo é um bi-radical. A partir desse estrado tripleto, ele pode ser ativado ou por reversão do spin em um dos elétrons não empareados para formar o estado singlete ou pela redução. A primeira redução é endotérmica, formando superóxido. Reduções subseqüentes formam peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e água. O estado eletrônico de cada etapa de ativação é mostrada com a reação em kcal/mole (adaptado de McKersie, 1996).

Durante muito tempo, os cloroplastos foram considerados os principais produtores de ROS nas células e conseqüentemente, um dos principais alvos dos ROS durante os estresses (MITTLER, 2002). Entretanto, as mitocôndrias também são sítios de



produção de ROS. Estudos recentes, sugerem que, quando a concentração de ROS aumenta no meio mitocondrial, ocorre morte celular programada (LAM *et al.*, 2001). Contudo, tanto as mitocôndrias, quanto os cloroplastos, devem possuir mecanismos eliminadores de ROS.

Uma das características mais importantes do  $H_2O_2$  é sua capacidade de difundir-se livremente através das aquaporinas (HENZIER e STEUDLE, 2000). Dessa forma, os ROS produzidos nos cloroplastos e nas mitocôndrias, por exemplo, podem afetar outros compartimentos celulares. Como prova dessa idéia, Karpinski *et al.* (1997) e Mittler (2002) relatam que os estresses capazes de aumentar a produção de ROS no cloroplasto induzem mecanismos de eliminação de ROS citosólicos e não, mecanismos de eliminação de ROS cloroplásticos. Portanto, o citosol, assim como os peroxissomas, podem atuar como zonas de tamponamento para o controle dos ROS, que alcançam diferentes compartimentos celulares, durante o metabolismo normal e em situações de estresse.



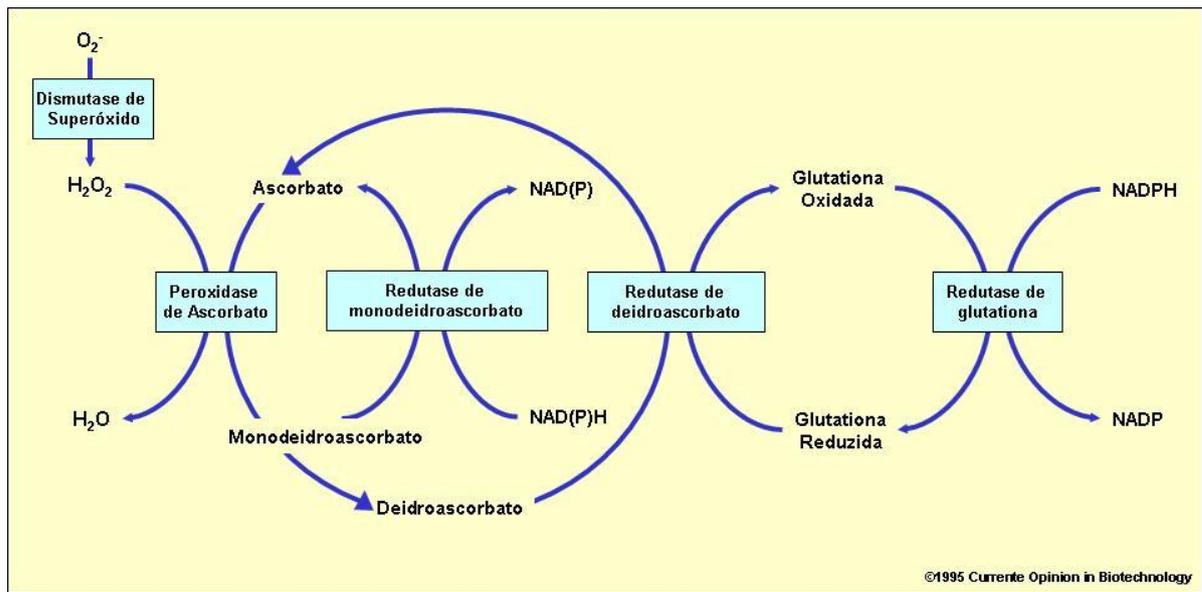
**Tabela 01** – Produção, eliminação e escape dos intermediários reativos de oxigênio em plantas. Siglas: Apo - apoplasto; Chl - cloroplasto; CW - parede celular; Cyt - citosol; ET - transporte de elétrons; Mit - mitocôndrias;  $O_2^1$  - oxigênio singlete; Per - peroxissoma; PM - membrana plasmática; PS - fotossistema; ROS – espécies reativas de oxigênio; Vac - vacúolo.

MECANISMO	LOCALIZAÇÃO	ROS
<b><u>Produção</u></b>		
Fotossíntese ET e PSI ou II	Chl	$O_2^-$
Respiração ET	Mit	$O_2^-$
Oxidase de glicolato	Per	$H_2O_2$
Clorofila excitada	Chl	$O_2^1$
NADPH oxidase	PM	$O_2^-$
$\beta$ -oxidação de ácidos graxos	Per	$H_2O_2$
Oxidase de oxalato	Apo	$H_2O_2$
Oxidase de xantina	Per	$O_2^-$
Peroxidases, $Mn^{+2}$ e NADH	CW	$O_2^-$ , $H_2O_2$
Oxidase de aminas	Apo	$H_2O_2$
<b><u>Eliminação</u></b>		
Dismutase de superóxidos	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	$O_2^-$
Peroxidase de ascorbato	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	$H_2O_2$
Catalase	Per	$H_2O_2$
Peroxidase de glutaciona	Cyt	$H_2O_2$ , ROOH
Peroxidases	CW, Cyt, Vac	$H_2O_2$
Peroxidase de tioredoxina	Chl, Cyt, Mit	$H_2O_2$
Ácido ascórbico	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	$O_2^-$ , $H_2O_2$
Glutaciona	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	$H_2O_2$
$\alpha$ -tocoferol	Membranas	$O_2^1$ , ROOH
Carotenóides	Chl	$O_2^1$
<b><u>Escape</u></b>		
Adaptações anatômicas	Estrutura foliar, epiderme	$O_2^-$ , $H_2O_2$ , $O_2^1$
Metabolismo $C_4$ ou CAM	Chl, Cyt, Vac	$O_2^-$ , $H_2O_2$
Movimento cloroplástico	Cyt	$O_2^-$ , $H_2O_2$ , $O_2^1$
Suspensão da fotossíntese	Chl	$O_2^-$ , $H_2O_2$
Modulação dos OS e antenas	Chl	$O_2^-$ , $O_2^1$
Alternativa oxidase	Chl, Mit	$O_2^-$

Fonte: MITTLER, 2002

No citosol, o ciclo ascorbato-glutaciona é uma via eficiente para eliminação dos ROS. Essa via, geralmente é atuante em localizações celulares que são atingidas por  $H_2O_2$  e não tem catalase presente. O ciclo ascorbato-glutaciona utiliza o ácido ascórbico e a glutaciona como substratos redutores (INZÉ e VAN MONTAGU, 1995) (Figura 07). As enzimas envolvidas neste ciclo de oxidação/redução são a redutase de monodesidroascorbato (MDHAR), redutase de desidroascorbato (DHAR), e redutase de glutaciona (GR). Em mitocôndrias purificadas a partir de folhas de ervilha, já foi

observado a presença de todas as enzimas do ciclo (JIMÉNEZ *et al.*, 1997). As quatro enzimas, peroxidase de ascorbato (APX), redutase de monodesidroascorbato (MDHAR), redutase de desidroascorbato (DHAR) e redutase de glutaciona (GR) foram evidenciadas em peroxissomas. Da mesma forma, em peroxissomas e mitocôndrias, a presença de ascorbato e glutaciona com suas formas oxidadas, desidroascorbato (DHA) e GSSH (glutaciona reduzida), respectivamente, foram identificados por HPLC (JIMÉNEZ *et al.*, 1997).



**Figura 07** – O ciclo ascorbato-glutaciona. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é removido pela peroxidase ascorbato e o ascorbato é regenerado pelo ciclo ascorbato-glutaciona, o qual envolve a redutase de monodesidroascorbato, redutase de desidroascorbato e redutase de glutaciona. Quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é consumido, o ascorbato é primeiramente oxidado para monodesidroascorbato. Se o monodesidroascorbato não é rapidamente reduzido novamente a ascorbato pela redutase de monodesidroascorbato, ele é convertido espontaneamente a desidroascorbato. O desidroascorbato é reciclado a ascorbato utilizando glutaciona reduzida que é regenerada através da ação da redutase de glutaciona em uma reação dependente de NADPH (adaptado de INZÉ e VAN MONTAGU, 1995).

### 5.3. Enzimas relacionadas à eliminação de ROS

#### a) Dismutases de Superóxidos [EC 1.15.1.1]

A SOD é atualmente conhecida por catalisar a dismutação de superóxido, na formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio (MCKERSIE, 1996; ROUT e SHAW, 2000; BREUSEGEM *et al.*, 2001) pela reação:



Evidenciada em praticamente todos os organismos aeróbios, na maioria dos compartimentos subcelulares geradores de oxigênio ativado, atualmente é sabido que a SOD possui uma função central na defesa dos organismos contra o estresse oxidativo (SCANDALIOS, 1993; BHATTACHARYA *et al.*, 2001; BORSANI *et al.*, 2001; MARTINEZ *et*



*al.*, 2001; POLLE, 2001). De uma maneira geral, existem três isoenzimas de SOD em plantas, classificadas com base em seu cofator metálico: cobre/zinco (Cu/Zn – SOD); manganês (Mn-SOD) e o ferro (Fe-SOD) (BANNISTER *et al.*, 1987).

Essas isoenzimas podem ser separadas por eletroforese nativa em gel de poliacrilamida e sua atividade detectada por revelação negativa com base na sua sensibilidade ao KCN e/ou ao superóxido. Existem distinções entre as isoenzimas, como, por exemplo, a afinidade com substratos: a Mn-SOD é resistente ao KCN e ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que a Cu/Zn-SOD é sensível a ambas substâncias. Fe-SOD é resistente ao KCN e sensível ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As isoenzimas da SOD também se distinguem pela distribuição subcelular: a Mn-SOD é comumente encontrada na mitocôndria de células eucarióticas; algumas isoenzimas Cu/Zn-SOD são encontradas no citosol e outras em cloroplastos de plantas superiores (MCKERSIE, 1996).

As Fe-SOD não são detectadas em plantas com frequência, mas quando evidenciadas, estão usualmente associadas com os cloroplastos (BOWLER *et al.*, 1992). Peroxissomas e glioxissomas também podem ter atividade Cu/Zn-SOD e Mn-SOD (SANDALIO e DEL RIO, 1988; DEL RIO *et al.*, 1998; HERNÁNDEZ *et al.*, 1995, 2001), mas não existiam, até pouco tempo, citações se referindo a SOD extracelular em plantas (MCKERSIE, 1996). Entretanto, recentemente, foi encontrado em apoplasto de folhas de *Hordeum vulgare* e *Avena sativa* a presença, não apenas de atividade da SOD, mas também de CAT e outras enzimas antioxidativas do ciclo ascorbato-glutationa (HERNÁNDEZ *et al.*, 2001). Em raízes, como não existem plastos, há a predominância de SOD citosólica e mitocondrial.

#### ***b) Catalases [EC 1.11.1.6.]***

A catalase é uma enzima que possui um grupamento *heme* em sua estrutura e catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sem utilizar antioxidantes não enzimáticos (ZÁMOCKY *et al.*, 2001). A enzima é encontrada em todos os eucariotos aeróbios e é muito importante na remoção do peróxido de hidrogênio produzido nos peroxissomas e glioxissomas pelas oxidases, envolvidas na β-oxidação de ácidos graxos, nas reações do glioxilato (fotorrespiração) e no catabolismo das purinas (BREUSEGEM *et al.*, 2001).

Diversas formas de catalase foram descritas em muitas espécies de plantas (PEIXOTO, 1998). Em milho, por exemplo, foram encontradas três isoformas (*cat-1*, *cat-2* e *cat-3*) cujos genes estão em cromossomos separados e são expressos e regulados distintamente (BREUSEGEM *et al.*, 2001), em diferentes localizações celulares: *cat-1* e *cat-2* localizadas nos peroxissomas e no citosol; *cat-3* na mitocôndria (SCANDALIOS, 1990). Breusegem *et al.* (2001) sugerem, ainda, que as catalases são as principais enzimas de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas. Vale ressaltar, que as catalases e as peroxidases são consideradas enzimas presentes em plantas tolerantes à salinidade (ROUT e SHAW, 2001).

#### ***c) Peroxidases***

As peroxidases são, provavelmente, as enzimas mais amplamente distribuídas, sendo, aparentemente, as mais estáveis das enzimas associadas com a oxidação, em tecidos de plantas (MCKERSIE, 1996). As peroxidases de planta são



glicoproteínas que contêm um grupamento *heme* em sua estrutura e possuem a função básica de catalisar a oxidação do peróxido de hidrogênio, a partir de numerosas espécies de substratos orgânicos e inorgânicos, tais como citocromo c, nitrito, ascorbato, indolaminas e outros (ZÁMOCKY, 2001). As peroxidases ocorrem em numerosas isoformas, tanto em animais, como em plantas. Alguns exemplos dos processos fisiológicos, nos quais existe a participação de peroxidases de plantas são: o metabolismo das auxinas, biossíntese do etileno, formação de lignina, respiração, processos intermediados por luz, defesa da planta contra patógenos, crescimento e senescência (DATTA e MUTHUKRISHNAN, 1999).

As peroxidases são classificadas em dois grandes grupos: a superfamília das peroxidases de planta e a superfamília das peroxidases de animal. As peroxidases são também evidenciadas em fungos e bactérias (LOPRASERT *et al.*, 1989; LOEWEN, 1990). Entretanto, devido à seqüência de aminoácidos das peroxidases de fungos e bactérias serem semelhantes, as peroxidases de planta em suas estruturas primárias e terciárias, essas enzimas são catalogadas na superfamília das peroxidases de planta (WELINDER *et al.*, 1992). A superfamília das peroxidases de planta pode ser subdividida em três classes principais. A classe I é intracelular e de organismos procarióticos (peroxidases de citocromo c, de bactérias, de cloroplastos e peroxidases de ascorbato citosólica). A classe II inclui as peroxidases extracelulares fúngicas (peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium* e peroxidase de *Coprinus cinereus*). A classe III inclui a maioria das peroxidases extracelulares vegetais (peroxidase de horseradish, por exemplo) (DATTA e MUTHUKRISHNAN, 1999).

Com relação a sua funcionalidade, Sreenivasulu *et al.* (1999) relata que o aumento da produção de ROS é responsável pela peroxidação de membranas lipídicas. O grau de danos peroxidativos é controlado por um sistema enzimático antioxidativo, composto por peroxidases. O aumento na atividade peroxidásica total, durante condições de estresse salino, reflete modificações nas propriedades mecânicas da parede celular e na integridade das membranas. A atividade das peroxidases é freqüentemente alta, durante a resposta a agentes estressores, onde essas enzimas possuem a função principal de proteger as células contra reações oxidativas (CAKMAK e HORST, 1991).

Segundo Gaspar *et al.* (1985), o aumento na atividade de peroxidases não resulta da síntese *de novo*, mas da ativação de enzimas preexistentes nos tecidos. Em oposição a essa afirmativa, Peixoto (1998) relata que as peroxidases ácidas, rapidamente incorporam aminoácidos marcados, indicando alta taxa de síntese.

#### ***d) Peroxidases dependentes de ascorbato (APX) [EC. 1.11.1.11]***

As peroxidases de ascorbato (APX) são heme-peroxidases cujo grupo prostético é uma protoporfirina. As APX apresentam alta especificidade por ascorbato, o qual funciona como substrato redutor. Em geral, são inibidas por cianeto e azida e, em conjunto com as CATs, catalisam a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para água no meio intracelular (SHIGEOKA *et al.*, 1980; CHEN e ASADA, 1989). No entanto, comparadas as CATs, as APX possuem maior afinidade por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menor velocidade de reação (NOCTOR e FOYER, 1998). A reação catalisada pela APX é a primeira reação do ciclo ascorbato-glutationa ou ciclo Halliwell-Asada (Figura 07). Esse ciclo é particularmente importante para o equilíbrio redox no cloroplasto (MCKERSIE, 1996). Entretanto, isoformas desta



enzima são encontradas em todos os compartimento celulares como mitocôndrias e citosol (FOYER e NOCTOR, 2000).

*e) Peroxidases de parede celular (POX) [E.C. 1.11.1.7]*

As peroxidases também são ativas na lignificação da parede celular. A parede celular de plantas é envolvida nas respostas ao estresse osmótico (AMAYA *et al.*, 1999). A adaptação de células de tomate às altas concentrações de sal no meio de cultura, é correlacionada com modificações na parede celular. Essas modificações são correlacionadas com transcritos TPX2 de um gene de peroxidase de tomate (AMAYA *et al.*, 1999). O TPX não é induzido pelo NaCl e, somente após as paredes celulares se adaptarem ao NaCl no meio de cultura, é que há detecção de transcritos TPX (AMAYA *et al.*, 1999).

A oxidação dos álcoois hidroxicinâmicos, precursores imediatos da lignina, é catalisada por peroxidases, resultando na produção de radicais fenoxi-mesoméricos, que reagem espontaneamente durante a deposição de lignina na parede celular (PEIXOTO, 1998). As maiores atividades de peroxidases ácidas são detectadas nas paredes celulares, sendo que a parede primária representa a matriz sobre a qual ocorre a lignificação (GASPAR *et al.* 1985). De acordo com Jbir *et al.* (2001), existe uma taxa maior de lignificação em raízes de trigo, quando expostas à salinidade. Este aumento está correlacionado com o aumento da atividade de peroxidases de parede celular.

## **6. RAÍZES DE FEIJÃO CAUPI COMO MODELO PARA O ESTUDO DE FISIOLOGIA DOS ESTRESSES**

Os organismos, quando analisados pelos aspectos microscópicos e químicos, são notavelmente semelhantes entre si (LEHNINGER *et al.*, 1995). Portanto, ao se escolher um modelo experimental, deve-se levar em consideração que as respostas obtidas, podem (ou não) serem extrapoladas para outras espécies. Adicionalmente, é de fundamental importância, a escolha de modelos que sejam economicamente relevantes, de fácil manuseio e curto ciclo biológico.

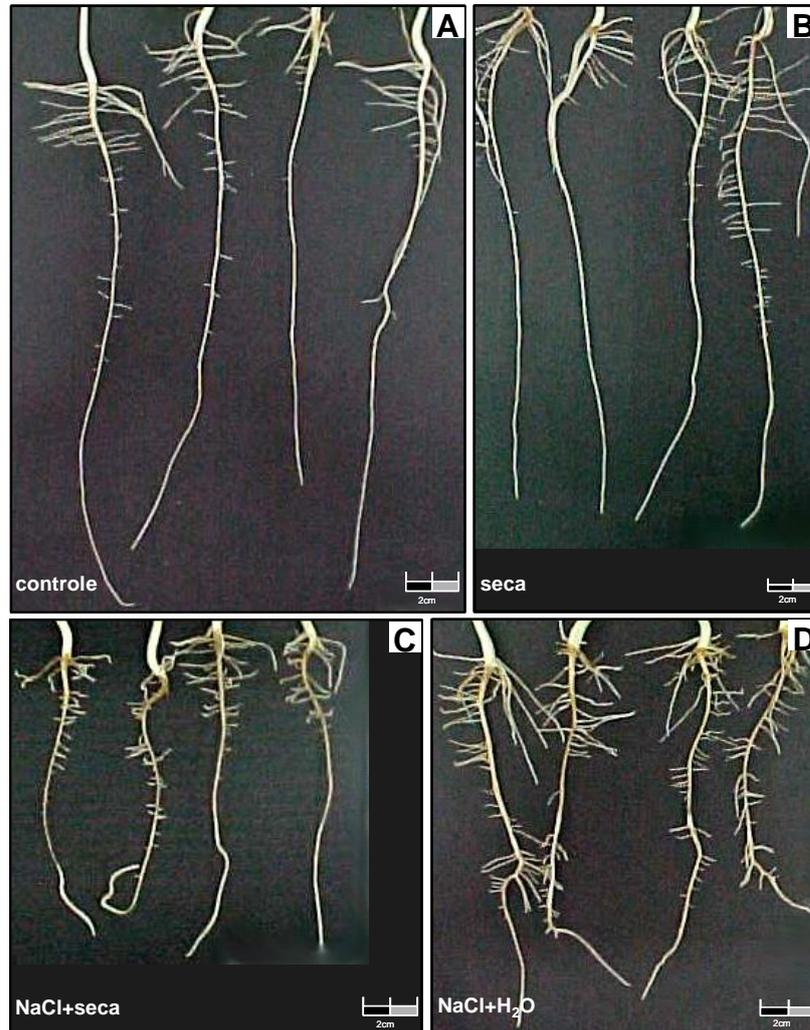
A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp., caracterizada fisiologicamente como pertencente ao grupo de plantas que fixam CO<sub>2</sub> através da síntese do ácido 3-fosfoglicérico (Ciclo de Calvin) (TAIZ e ZEIGER, 1991), além de ser predominantemente autógama (BLACKHURST e MILLER JR., 1980), fixadora de nitrogênio (através de simbioses), possuidora de ampla variabilidade genética e excelente potencial de produção e adaptação (FREIRE-FILHO *et al.*, 2003), sendo uma glicófita, também é sensível à salinidade (GREENWAY e MUNNS, 1980), embora muito bem adaptado às condições de temperaturas elevadas e seca ambiental, quando comparado a outras espécies agrícolas (EHLERS e HALL, 1997).

Contudo, a maior atenção tem sido dada aos efeitos dos estresses na parte aérea, pois esta tem relação direta com a produtividade da espécie (Maia *et al.*, 2010). Contudo, o sistema radicular, não apresentando atividade fotossintetizante significativa, realiza predominantemente atividade respiratória e, portanto, as estratégias de resposta aos estresses são distintas da parte aérea. Em nossos trabalhos diversas evidências foram observadas. Maia *et al.* (2012) e Maia (2008) demonstraram que o efeito da seca e da salinidade no crescimento do sistema radicular é distinto (Figura 08). Enquanto a seca



estimula o crescimento, o estresse salino inibe o crescimento da raiz principal, possivelmente através da morte do meristema apical. Ainda, sugere que é possível identificar uma resposta interativa quando plantas de caupi estão submetidas a um ambiente salino que sofra também efeito de seca ambiental.

Nossos estudos levam a sugerir que tanto a seca como a salinidade induzem uma resposta antioxidante secundária e que são antagônicas. Para plantas tratadas com seca, é possível que o crescimento do sistema radicular seja influenciado pela redução da atividade do sistema antioxidante apoplástico, seguido pela maior atividade do sistema antioxidante citosólico e de alterações em marcadores do metabolismo osmótico. Em condições de estresse salino, a restrição do crescimento do sistema radicular seria possivelmente uma estratégia de defesa oxidativa, através do aumento da atividade antioxidante do apoplasto (Maia, 2008; Maia et al. 2012). Essa região do tecido apresenta uma rota de remoção de espécies reativas de oxigênio que envolve o aumento da concentração de lignina, uma das moléculas relacionadas com o amadurecimento celular através da produção de parede secundária (Maia, 2008). Contudo, é importante ressaltar que mais estudos devem ser realizados para confirmar esse comportamento, principalmente em outras espécies vegetais.



**Figura 08** – Comparação do desenvolvimento das raízes de plântulas de feijão caupi, cv. Pitiúba, com 10 dias após plantio, sob efeito dos tratamentos controle [A], seca [B], NaCl+seca [C], NaCl+água [D] durante 48 horas. As figuras estão na mesma escala de comprimento. (Adaptado de Maia, 2004)

## AGRADECIMENTOS

Maia, J.M. agradece a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) pela bolsa de mestrado concedida durante a sua dissertação de mestrado e a Revista Biofarm pelo convite para publicação. Silva, A. F. e Lira, E. H. A. agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de suas bolsas de Mestrado.

## REFERÊNCIAS

ALAM, S. M. Nutrient uptake by plants under stress conditions. In: PASSARAKLI, M. (org.). **Handbook of Plant and Crop Stress**. New York: M Dekker Inc., p:227-246. 1994.



ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, L. Reactive oxygen species and antioxidants relationship in green cells. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.224-233, 1997.

AMAYA, I.; BOTELLA, M. A.; DE LA CALLE, M.; MEDINA, M. I.; HEREDIA, A.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; QUESADA, M. A.; VALPUESTA, V. Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. **FEBS Letters**, v. 457, p.80-84, 1999.

AMZALLAG, G. N.; LERNER, H. R.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Induction of increased salt tolerance in sorghum bicolor by NaCl pretreatment. **Journal of Experimental Botany**, v.41, n.222, p.29-34, 1990.

APSE, M. P.; AHARON, G. S.; SNEDDEN, W. A.; BLUMWALD, E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. **Science**, v. 285, p.1256-1258, 1999.

ARAÚJO, J. P. P. DE; WATT, E. E. (org.). **O feijão-de-corda no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. 722p.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p.235-241, 1992.

ASPINALL, D.; PALEG, L. G. Proline accumulation: physiological aspects. In: PALEG, L. G.; ASPINALL, D. (org.). **The Physiology and biochemistry of drought resistance**, New York: Academic Press, 1981. p.206-240.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água para irrigação**, Campina Grande: UFPB, 1991. 218p.

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

BANNISTER, J. V.; BANNISTER, W. H.; ROTILS, G. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. **CRC Critical Review in Biochemistry**, v.22, p.110-180, 1987.

BARTELS, D. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? **Trends in Plant Science**, v.6, p.284-286, 2001.

BERLATO, M. A. Carta de aptidão climática da soja no Rio Grande do Sul. In: MIYSAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**, São Paulo: [s.n.], 1ª ed., 1981. 1062p.



BHATTACHARYA, A.; GHOSAL, S.; BHATTACHARYA, S. H. Anti-oxidant effect of *Withania somnifera* glycowithanolides in chronic footshock stress-induced perturbations of oxidative free radical scavenging enzymes and lipid peroxidation in rat frontal cortex and striatum. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.1-6, 2001.

BLACKHURST, H. T.; MILLER JR., J. C. Cowpea. In: FEHR, W. R.; HANDLEY, H. H., (org.) **Hybridization of crop plants**. Madison: American Society Agronomy, 1980, p.327-37.

BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Metabolic engineering for increased salt tolerance – the next step. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 23, p.661-667, 1996.

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 7, p.1099-1111, 1995.

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

BORSANI, O., DIAZ, P., AGIUS, M. F., VALPUESTA, V., MONZA, J. Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. **Plant Science**, v.161, p.757-763, 2001.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.

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

BRADFORD, K. J.; HSIAO, T. C. Physiological responses to moderate water stress. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (org.). **Physiological plant ecology II, water relations and carbon assimilation**, New York: Springer-Verlag, 1982. p.263-324.

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

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p. 405-414, 2001.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, p.463-468, 1991.

CARDOSO, B. B. **Efeitos comparativos da salinidade sobre o metabolismo do nitrogênio em folhas e nódulos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] inoculado com *Bradyrhizobium* sp.** 2000. Tese (Doutorado em Bioquímica) –



Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

CAVALCANTI, F. R. **Atividade de enzimas antioxidativas e integridade de membranas em plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] submetidas ao estresse salino**, 2002, 62 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

CHAPMAN, V. J. The salinity problem in general, its importance and distribution with special reference to natural halophytes. In: POLKAKOFF-MAYBER, A.; GALE, J. (org.). **Plants in saline environments**, New York: Springer-Verlag, p.7-24, 1975.

CHEN, G.-X.; ASADA, K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isoenzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. **Plant Cell Physiology**, v. 30, p.987-998, 1989.

COSTA, R.C.L. **Assimilação de nitrogênio e ajustamento osmótico em plantas noduladas de feijão-de-corda *Vigna unguiculata* (L.) Walp, submetidas a estresse hídrico**. 1999. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999. 255p.

DANTAS, J. P.; MARINHO, F. J. L.; FERREIRA, M. M. M.; AMORIM, M. do S. N.; ANDRADE, S. I. de O.; SALES, A. L. de. Avaliação de genótipos de feijão-de-corda sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 3, p.425-430, 2002.

DATTA, S. K., MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**. London: Ed: Boca Raton, 1999. 291p.

DEL RIO, L. A.; PASTORI, G. M.; PALMA, J. M. SANDALIO, L. M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F. J.; JIMÉNEZ, A.; LÓPEZ-HUERTAS E.; HERNÁNDEZ, J. A. The activated oxygen role of Peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, v.116, p.1195-1200, 1998.

DIONISIO-SESE, M. L., TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, v.135, p.1-9, 1998.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Field Crops Research**, v.53, p.187-204, 1997.

EPSTEIN, E.; NORLYN, J. D.; RUSH, D.W.; KINGSBURY, R. W.; KELLY, D. B.; CUNNINGHAM, G. A.; WRONA, A. F., Saline culture of crops: a genetic approach, **Science**, v. 210, p.399-404, 1980.

FAGERIA, N. K. **Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas**. Brasília: Departamento de Publicações EMBRAPA-CNPAP, 1ª ed., 1989.



FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, v. 146, p.359-388, 2000.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. F. Melhoramento genético de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) na região do Nordeste. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas no Nordeste brasileiro**. [S.l.]: [s.n.], 2003. 30p.

GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, v.64, n.3, p.418-423, 1985.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, v.124, p.21-29, 2000.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.149-190, 1980.

GROVER, A.; SAHI, C.; SANAN, N.; GROVER, A. Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. **Plant Science**, v.143, p.101-111, 1999.

GRUWEL, M. L. H.; RAUW, V. L.; LOEWEN, M.; ABRAMS, S. R. Effects of sodium chloride on plant cells; a  $^{31}\text{P}$  and  $^{23}\text{Na}$  NMR system to study salt tolerance. **Plant Science**, v.160, p.785-794, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 1985.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Lancet**, 1984. p.1396-1398.

HAMILTON, E. W. III; HECKATHORN, S. A. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small Heat Shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. **Plant Physiology**, v.126, p.1266-1274, 2001.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v.8, p.1773-1791, 1996.

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

HELLEBUST, J. A., Osmoregulation, **Annual Review of Plant Physiology**, v.27, p.485-505, 1976.



HENZIER, T.; STEUDLE, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.2053-2066, 2000.

HERNÁNDEZ, J. A.; CORPAS, F. J.; GÓMES, M.; DEL RIO, L. A.; SEVILLA, F. Salt-Induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.89, p.103-110, 1993.

HERNÁNDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMÉNEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, v.127, p.817-831, 2001.

HERNÁNDEZ, J. A.; OLMOS, E.; CORPAS F. J.; SEVILLA, F.; DEL RIO, L. A. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. **Plant Science**, v.105, p.151-167, 1995.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITNIK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, n.9, p.431-438. 2001.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. **Plant Physiology**, v. 83, p.517-524, 1987.

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

INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p.153-158, 1995.

JBIR, N.; CHAIBI, W.; AMMAR, S.; JEMMALI, A.; AYADI, A. Root grown and lignification of two wheat species differing in their sensitivity to NaCl, in response to salt stress. **Life Sciences**, v.324, p.863-866, 2001.

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J. A.; DEL RIO, L. A.; SEVILLA, F. Evidence of the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, v.114, p.275-284, 1997.

JOLIVET, Y.; HAMELIN, J.; LARHER, F. Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effects of glycinebetaine and other related solutes against the oxalate destabilization of membranes in beet root cells. **Z Pflanzenphysiol**, v.109, p.171-180, 1983.



KARPINSKI, S.; ESCOBAR, C.; KARPINSKA, B.; CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P.M. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. **Plant Cell**, v.9, p.627-640, 1997.

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

KJELLBOM, P.; LARSON, C.; JOHANSSON, I.; KARISSESON, M.; JOHANSON, U. Aquaporins and water homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v.4, n.8, p.308-314, 1999.

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

KUZNETSOV, V. V.; RAKITIN, V. Y.; ZHOLKEVICH, V. N. Effects of preliminary heat-shok treatment on accumulation of osmolytes and drought resistance in cotton plants during water deficiency. **Physiologia Plantarum**, v.107, p.399-406, 1999.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M., Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response, **Nature**, v.411, p.848-853, 2001.

LEA, P. J. Primary nitrogen metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (org.), **Plant biochemistry**, California: Academic Press, 1997, p.273-306.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Ed. Sarvier, 2ª ed., 1995. 839p.

LOEWEN, P.C. EMBL data library, accession number X53001 (STKATG), 1990.

LOGGINI, B.; SCARTAZZA, A.; BRUGNOLI, E.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. **Plant Physiology**, v.119, p.1091-1100, 1999.

LOPRASERT, S.; NEGORO, S.; OKADA, H. Cloning, nucleotide sequence and expression in *E. coli* of the *Bacillus stearothermophilus* peroxidase gene (*perA*). **Journal of Bacteriology**, v.171, p.4871. 1989.

MAATHUIS, F. J. M.; AMTMANN, A.  $K^+$  nutrition and  $Na^+$  toxicity: the basis of cellular  $K^+/Na^+$  ratios. **Annal of Botany**, v.84, p.123-133, 1999.

MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L. MACÊDO, C. E. C.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasílica**, v.26, n.2, p. 342-349, 2012.

MAIA, J. M.; VOIGT, E. L.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FONTENELE, A. V.; MACÊDO, C. E. C.; SILVEIRA, J. A. G. Differences in cowpea root growth triggered



by salinity and dehydration are associated with oxidative modulation involving types I and III peroxidases and apoplastic ascorbate. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2, p.376-387, 2012.

MAIA, J. M.; MACÊDO, C. E. C.; VOIGT, E. L.; FREITAS, J. B. S.; SILVEIRA, J. A. G. Antioxidative enzymatic protection in leaves of two contrasting cowpea cultivars under salinity. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p.159-163, 2010.

MAIA, J. M. **Restrição de crescimento induzida por estresse salino como uma estratégia de defesa oxidativa em raízes de feijão-caupi**. 2008, 159f., Doutorado (Doutorado em Bioquímica Vegetal) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

MAIA, J. M. **Efeitos aditivos e interativos de tratamentos de seca e NaCl na resposta antioxidativa de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)]**, 2004, 129f., Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

MANSOUR, M. M. F.; SALAMA, K. H. A.; AL-MUTAMA, M. M. Transport proteins and salt tolerance in plants. **Plant Science**, v. 164, p.891-900, 2003.

MARTINEZ, C. A., LOUREIRO, M. E., OLIVA, M. A., MAESTRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative stress and water stress. **Plant Science**, v.160, p.505-515, 2001.

MARX, J. L. Oxygen free radicals linked to many diseases. **Science**, v.235, p.529-531, 1985.

MAXWELL, D. P., WANG, Y., MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen's production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of science of the USA**, v.96, p.8271-8276, 1999.

McCREE, K. J.; RICHARDSON, S. G. Stomatal closure vs. osmotic adjustment: a comparison of stress responses. **Crop Science**, v.27, p.539-543, 1987.

McKERSIE, B.D. **Plant Environment Interactions and Stress Physiology**: module 2. In: Penn State College of Agricultural Sciences, Courses - Univ. of Guelph. Disponível em: <[www.agronomy.psu.edu/courses/agro518/contends.htm](http://www.agronomy.psu.edu/courses/agro518/contends.htm)>. Acesso em 1996.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Review, **Trends in Plant Science**, v.2, p.1360-1385, 2002.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**, 1ª ed. São Paulo: ITAL, 1981, p.1-174.



NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. Water management. In: FAO – Food and agriculture organization of the United Nations, Tropical soybean: Improvement and production. **FAO – Plant production and protection series**, 27<sup>a</sup> ed., 1994. p.153-160.

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

OLIVEIRA, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. In: Congresso Brasileiro de Eng. Agrícola, 26, 1997, Campina Grande. **Anais...**Campina Grande, 1997. p.1-35.

PALEG, L.G.; STEWART, G.R.; BRADBEER, J.W. Proline and glycine betaine influence protein solvation. **Plant Physiology**, v.75, p.974-978, 1984.

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

PEIXOTO, P. H. P. **Peroxidação de lipídios em membranas de tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio**, 1998, 95f., Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

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

POLLARD, A.; JONES, R. G. W. Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. **Planta**, v.144, p.291–298, 1979.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, v.126, p.445-462, 2001.

PRICE, A. H.; HENDRY, G. A. F. The significance of the tocopherols in stress survival in plants, In: RICE-EVANS, C. (Ed.), **Free Radicals, Oxidant Stress and Drug Action**, London: Richelieu Press, p.443–450, 1987.

PRIMAVESI, A. **Manejo Ecológico do Solo**. São Paulo: Ed. Nobel, 9<sup>a</sup> ed., 1987. 549p.

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

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



ROMO, S.; LABRADOR, E.; DOPICO, B. Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietum* seedlings and plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.1017-1026, 2001.

ROUT, N. P.; SHAW, B. P. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. **Plant Science**, v.160, p.415-423. 2001.

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

SANDALIOS, M.; DEL RIO, L. A. Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). **Plant Physiology**, v.88, p.1215-1218, 1988.

SANTOS, D. R.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. Inoculação do feijão-de-corda em solo salinizado da região semi-árida do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p.291-295, 1990.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, v.28, p.1-41, 1990.

SELOTE, D. S.; BHARTI, S.; KHANNA-CHOPRA, R. Drought acclimation reduces O<sub>2</sub><sup>-</sup> accumulation lipid peroxidation in wheat seedlings. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, p.724-729, 2004.

SERRANO, R.; RODRIGUEZ-NAVARRO, A. Íon homeostasis during salt stress in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, p.399-404, 2001.

SHALATA, A.; TAL, M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.169–174; 1998.

SHIGEOKA, S.; NAKANO, Y.; KITAOKA, S. Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z by L-ascorbic acid peroxidase. **Biochemistry Journal**, v.186, p.377-380, 1980.

SIEMENS, J. A.; ZWIAZEK, J. J. Effects of water stress and recovery on the root water relations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. **Plant Science**, v.165, p.113-120, 2003.

SILVEIRA, J. A. G. da, Mecanismos bioquímicos de resposta das plantas a fatores de estresse ambiental. In: Encontro nacional de biólogos, 5., 2003, Natal. **Anais...Natal:CRB**, 2003.



SILVEIRA, J. A. G.; CARDOSO, B. B.; MELO, A. R. B.; VIÉGAS, R. A. Salt-induced decrease in nitrate uptake and assimilation in cowpea plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.2, P.77-82, 1999.

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; OÑATE-SÁNCHEZ. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.430-436, 2002.

SMIRNOFF, N.; COLOMBE, S. V.; Drought induces the activity of the enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. **Journal of Experimental Botany**, v.39, p.1097-1108, 1988.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 26, p.1057-1060, 1989.

SMIRNOFF, N.; STEWART, G. R. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. **Physiologia Plantarum**, v. 64, p.133-140, 1985.

SREENIVASULU, N. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. **Plant Science**, v.141, p.1-9, 1999.

STEUDLE, E.; PETERSON, C. A. How does water get through root? **Journal of Experimental Botany**, v.49, n.322, p.775, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. California: The Benjamín/Cumming Publishing Company, Inc., 1ª ed., 1991. 559p.

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

WELINDER, K. G., MAURO, J. M., NORSKOV-LAURITSEN, L. Structure of plant and fungal peroxidases. **Biochemical Society Transformation**, v.20, p.337, 1992.

WINICOV, I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. **Annals of Botany**, v. 82, p.703-710, 1998.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems, **Science**, v.217, p.1214-1222, 1982.

ZÁMOCKY, M.; REGELSBERGER, G.; JAKOPITSCH, C.; OBINGER, C. The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. **FEBS letters**, v.492, p.177-182, 2001.

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



ISSN 1983-4209 – Volume 11 – Número 01 – 2015

ZHU, J. K. Plant Salt Tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, n. 2, p.56-71, 2001b.

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