

EFEITO DA SALINIDADE SOBRE A BIOMASSA, MORFOLOGIA E
FISIOLOGIA DE *Salvinia auriculata* AUBL.

MARIA ANGÉLICA DA CONCEIÇÃO GOMES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

JULHO - 2011

EFEITO DA SALINIDADE SOBRE A BIOMASSA, FISIOLOGIA E
MORFOLOGIA DE *Salvinia auriculata* AUBL.

MARIA ANGÉLICA DA CONCEIÇÃO GOMES

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para a obtenção
do título de Mestre em Ecologia e Recursos
Naturais.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARINA SATIKA SUZUKI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

JULHO - 2011

“Uma vela nada perde quando acende outra que está apagada. Quando você é bom com os outros, é melhor para você mesmo”.

(Felipe Aquino)

*Aos meus pais,
José Reis e Maria Anita.*

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus, que nos deu o dom da vida, fruto de sua imensa bondade. A Nossa Senhora e a São José a quem tantas vezes recorro nos momento de dificuldades.

Agradeço aos meus pais José Reis e Maria Anita, pela educação que me deram, fruto de muito sacrifício, e por entenderem que almejo algo melhor para nós.

Agradeço a Professora Marina Satika Suzuki pela oportunidade, pela paciência e amizade durante todos esses anos de orientação.

As professoras Ângela Pierre Vitória e Cristina Maria Magalhães de Souza pelos ensinamentos e pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho e para minha formação.

A professora Claudete Santa Catarina pela dedicação e colaboração com o estudo de NO.

A professora Maura da Cunha pela colaboração com os estudos de microscopia.

Ao Professor Pedro Henrique Monnerat e o técnico José Acácio da Silva pelo auxílio nas determinações dos nutrientes.

As técnicas Beatriz, Geovana e Márcia Adriana pela amizade e apoio durante o preparo das amostras para o estudo da microscopia.

A amiga Cris Tullii pelo apoio com estudo de microscopia eletrônica de transmissão e óptica.

Aos técnicos do Laboratório de Ciências Ambientais.

Ao senhor Antônio pela ajuda fundamental nos trabalhos de campo.

A Andresa, Bruno, Elaine, Frederico, Inácio e Thamiris que também contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todas amigas e amigos que colaboraram para minha formação profissional e pessoal.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
O efeito do estresse salino nas plantas	2
Tolerância à salinidade	4
Macrófitas aquáticas	7
<u>HIPÓTESE</u>	<u>9</u>
<u>OBJETIVOS</u>	<u>9</u>
<u>CAPÍTULO 1</u>	<u>10</u>
Efeito do NaCl sobre a biomassa e fisiologia de <i>Salvinia auriculata</i> Aubl.	
Resumo	11
Introdução	12
Material e Métodos	13
Resultados	18
Discussão	26
<u>CAPÍTULO 2</u>	<u>35</u>
Efeito do estresse salino induzido por NaCl e Na ₂ SO ₄ sobre a fisiologia e morfologia de <i>Salvinia auriculata</i> Aubl.	
Resumo	36
Introdução	37
Material e Métodos	38
Resultados	41
Discussão	49
<u>DISCUSSÃO GERAL</u>	<u>54</u>
<u>CONCLUSÃO</u>	<u>57</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>58</u>

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Reagentes utilizados no preparo da solução nutritiva de micronutrientes de Hoagland e Arnon (1938).....13

Tabela 2: Reagentes utilizados no prepara da solução Ferro+EDTA.....13

Tabela 3: Reagentes utilizados para o preparo da solução macronutrientes Smart e Barko (1985) modificada.....14

Tabela 4: Teor de clorofila total e carotenóides [mg.g^{-1} PS] de *Salvinia auriculata* incubadas com NaCl, durante 5 dias. Entre parênteses estão os valores mínimos e máximos. Letras diferentes, para cada pigmento analisado, indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos pelo teste de Dunn.....19

Tabela 5: Conteúdo de nutrientes [mg.g^{-1} PS] em plantas de *Salvinia auriculata* incubadas com 0, 50, 100 e 150 mM de NaCl, durante 5 dias. Entre parênteses estão os valores mínimos e máximos. Letras diferentes, para cada nutriente analisado, indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos pelo teste de Dunn.....21

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Reagentes utilizados no preparo da solução de micro e macronutrientes de acordo com Hoagland e Arnon (1950) modificada.....39

Tabela 2: Concentração de nutrientes (mg.g^{-1} PS) em *S. auriculata* submetidas ao estresse salino induzido por NaCl e Na₂SO₄. Entre parênteses estão os valores mínimo e máximo. As letras referem-se à estatística entre os tratamentos controle e salinos com NaCl e Na₂SO₄.....42

Tabela 3: Mudanças no teor de clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , razão clorofila <i>a</i> /clorofila <i>b</i> (C _{loa} /C _{lob}) clorofila total (<i>a</i> + <i>b</i>) e carotenóides (mg.g ⁻¹ PS) na macrófita aquática <i>Salvinia auriculata</i> submetida ao estresse salino induzido pelos sais NaCl e Na ₂ SO ₄ . Entre parênteses estão os valores mínimo e máximo. As letras referem-se à estatística entre os tratamentos controle e salinos.....	43
Tabela 4: Mudanças no teor de prolina (μmol g ⁻¹ FW) nos diferentes tratamentos salinos. As letras referem-se à estatística entre os tratamentos controle e salinos com NaCl e Na ₂ SO ₄	44

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: *Salvinia auriculata*. www.elacuario.org8

CAPÍTULO 1

Figura 1: *Salvinia auriculata* obtidas na lagoa e acondicionada em caixa para transporte ao Laboratório de Ciências Ambientais – LCA/CBB/UENF.....15

Figura 2: Aspectos morfológicos de plântulas de *S. auriculata*, incubadas com 0 (Fila1), 50 (Fila 2), 100 (Fila 3) e 150 mM (Fila 4) de NaCl, em placa de cultura de 12 poços.....18

Figura 3: Alterações no peso fresco (PF) (a) e peso seco (PS) (b) de *S. auriculata* incubados com diferentes concentrações de NaCl, durante 5 dias. As barras horizontais indicam a mediana e as barras verticais indicam os valores mínimos e máximos. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos pelo teste de Dunn.....19

Figura 4: Conteúdo de prolina em *S. auriculata* incubadas com NaCl, durante 5 dias. As barras horizontais indicam a mediana e as barras verticais indicam os valores mínimos e máximos. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos pelo teste de Dunn.....22

Figura 5: Conteúdo extracelular de NO em plantas de *S. auriculata* após 2 horas (a) e 5 dias de incubação (b). As barras horizontais indicam a mediana e as barras verticais indicam os valores mínimos e máximos. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos e os símbolos indicam diferenças estatísticas entre os tempos pelo teste de Bonferroni.....23

Figura 6: Microscopia de fluorescência do conteúdo endógeno de NO em raízes de *S. auriculata* após 2 horas (a-h) e 5 dias (i a g) de incubação nos diferentes tratamentos com NaCl. Barras = 200 μm24

Figura 7: Fluorescência relativa (μm^2) de NO endógeno em raízes de *S. auriculata* após 2 horas (a) e 5 dias (b) de incubação nas diferentes concentrações de NaCl. Dados correspondem à mediana e as barras verticais indicam os valores mínimos e máximos. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e os símbolos indicam diferenças estatísticas entre os tempos pelo teste de Bonferroni.....25

CAPÍTULO 2

Figura 1: Microscopia óptica da secção transversal do limbo foliar de *Salvinia auriculata* evidenciando epiderme adaxial (ead), cloroplasto (c), grãos de amido (am), corpos fenólicos (cf). Barra A = 50 μm ; Barra B, C, D, E, F = 20 μm . Controle – A e B, 100 mM NaCl - C , 200 mM NaCl - D , 100 mM Na_2SO_4 - E , 200 mM Na_2SO_4 - F.....45

Figura 2: Microscopia eletrônica da transmissão do limbo foliar de *Salvinia auriculata* evidenciando mitocôndria , cloroplasto , grãos de amido , plastoglôbulos e granum. Barra A = 500nm; Barra B, E = 2 μm ; Barra C, D = 1 μm . Controle - A, 100 mM NaCl - B , 200 mM NaCl - C, 100 mM Na_2SO_4 - D, 200 mM Na_2SO_4 - E.....46

Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura do limbo foliar de *Salvinia auriculata*. Barra A = 500 μm ; Barra A, B, C, D, E, F = 200 μm . Controle - A e B, 100 mM NaCl - C, 200 mM NaCl D, 100 mM Na_2SO_4 - E, 200 mM Na_2SO_4 - F.....47

Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura do limbo foliar de *Salvinia auriculata*. As setas indicam os estômatos. Barra A = 500 μm ; Barra A, B, C, D, E, F = 20 μm . Controle - A e B, 100 mM NaCl - C, 200 mM NaCl D, 100 mM Na_2SO_4 - E, 200 mM Na_2SO_4 - F.....50

RESUMO

Salvinia auriculata é uma macrófita aquática flutuante com ampla distribuição nos sistemas aquáticos. Segundo a literatura científica esta macrófita é encontrada em ambientes de água doce. Entretanto, *S. auriculata* tem demonstrado grande plasticidade em colonizar ambientes alagados próximo ao mar. Desta forma, este estudo teve como objetivo elucidar os efeitos da salinidade sobre *S. auriculata* e inferir explicações sobre como estas plantas se desenvolvem em ambientes ligeiramente salobros. O primeiro capítulo descreve um experimento realizado em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 20 °C noturno e 25 °C diurno e concentrações de 0, 50 mM, 100 mM e 150 mM de NaCl. Nesta etapa foram avaliados o conteúdo nutricional, biomassa fresca e seca, teor de pigmentos fotossintéticos, teor de prolina e produção de NO. Após cinco dias de experimento com salinidade induzida por NaCl verificou-se o decréscimo do conteúdo nutricional com exceção do N. Isto ocorreu devido à competição iônica pela absorção destes nutrientes em presença de elevada concentração de Na⁺ e Cl⁻. O teor de clorofila *b* e clorofila total diminuíram e o teor de clorofila *a*, razão clorofila *a*/ clorofila *b* e carotenóides aumentaram. Estes resultados sugerem que a salinidade afeta negativamente o aparato fotossintético. A biomassa das plantas submetidas ao tratamento com 50 mM do sal, assim como o conteúdo de clorofila *a* e pigmentos totais foram maiores quando comparada a biomassa daquelas submetidas aos demais tratamentos, sugerindo que *S. auriculata* tem um bom desenvolvimento em ambientes oligohalinos. O teor de prolina aumentou significativamente nas plantas submetidas ao tratamento com 150 mM. A produção de NO extracelular e intracelular foi maior nas plantas com duas horas de incubação do que nas plantas com 5 dias de incubação na solução com as diferentes concentrações salinas. Isto se deve ao fato do NO apresentar maior atuação em um tempo curto de duração como um sinalizador para tolerância a salinidade. O segundo capítulo apresenta resultados de um experimento realizado em casa de vegetação onde as plantas foram submetidas as concentrações 0, 100 e 200 mM de NaCl e Na₂SO₄ em unidades experimentais individuais. Nesta fase também foram avaliados o conteúdo nutricional, teor de pigmentos fotossintéticos, teor de prolina, anatomia e adicionalmente a ultraestrutura foliar de *S. auriculata*. Após sete dias de experimento foi verificado nos tratamentos salinos a diminuição do conteúdo dos íons Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, P, N e do teor de pigmentos fotossintetizantes em *S. auriculata*

corroborando trabalhos anteriores. O teor de prolina mostrou uma tendência ao incremento quando comparado ao controle. Nos fragmentos das folhas de *S. auriculata* observados sob microscópio óptico foram visualizadas mudanças na estrutura das células do parênquima paliçádico e na estrutura dos cloroplastos das plantas submetidas aos tratamentos salinos. A microscopia eletrônica de transmissão evidenciou uma desorganização das membranas internas e externas dos cloroplastos das células das plantas submetidas à salinidade além de maior quantidade de grãos de amido. O microscópio eletrônico de varredura evidenciou a integridade dos tricomas e das células do limbo foliar de *S. auriculata* submetida ao tratamento controle e alteração na morfologia das células provocadas pela salinização. Para todos os efeitos avaliados foi observado que o incremento na concentração do sal Na_2SO_4 resultou em maior dano em *S. auriculata*.

Palavras Chave: Macrófitas Aquáticas, Biomassa, Microscopia, Nutrientes, Óxido Nítrico, Pigmentos Fotossintéticos, Prolina, Salinidade.

ABSTRACT

Salvinia auriculata is a floating aquatic macrophyte that presents a wide distribution in tropical aquatic systems. According to the scientific literature this macrophyte is a glycophyte, found in freshwater environments. However, *S. auriculata* has demonstrated great plasticity in colonizing wetlands close to the sea. In this way, this study was performed to elucidate the effects of salinity on *S. auriculata* and infer explanations about how these plants develop in slightly brackish environments. The first chapter describes the experiment performed in a germination chamber with a 12-hour photoperiod, with nocturnal temperature of 20 °C and daytime temperature of 25 °C, and concentrations of 0, 50 mM, 100 mM and 150 mM of NaCl. In this experiment the nutritional content, fresh and dry biomass, photosynthetic pigment content, proline content and production of NO were assessed. After five days of NaCl induced salinity it was verified a decrease in the nutritional content with the exception of the ammoniacal nitrogen. It occurred due to the ionic antagonism and the ionic competition in plant absorption. The content of chlorophyll b and total chlorophyll decreased, and the content of chlorophyll a, chlorophyll a/b, chlorophyll b and carotenoid increased. These results suggest that the salinity affects in a negative way the photosynthetic apparatus. The biomass of the plants submitted to treatment with 50 mM of NaCl, as well as the content of chlorophyll a and total pigments were higher when compared to the biomass of those submitted to the other treatments, suggesting that the *S. auriculata* has a good development in oligohaline environments. The content of proline significantly increased in the plants submitted to the treatment with 150 mM. The production of extracellular and intracellular NO was larger in plants with two hours of incubation than in the plants with five days of incubation with different saline concentrations. This is due to the higher NO production in a short time for tolerance to salinity. In the second chapter the experiment performed in the greenhouse where the plants were submitted to the concentrations of 0, 100 and 200 mM of NaCl and Na₂SO₄ separately. The nutritional content, contents of photosynthetic pigments and proline, anatomy and the ultrastructure of leaf of *S. auriculata*. Were evaluated after seven days. The decrease in the content of ions of Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, P, ammoniacal N and the photosynthetic pigments in *S. auriculata* were observed corroborating previous works. The content of proline showed an increase pattern. Structural changes in the cells of the palisade parenchyma and in the structure of chloroplasts were observed

in leaves fragments of *S. auriculata* under saline treatments. The transmission electron microscopy revealed a disorganization of the internal and external membranes of the chloroplasts in plants subjected to salinity, besides the larger amount of starch grains. The scanning electron microscope revealed the integrity of trichomes and leaf cells of control plants and changes in cell morphology caused by salinization. Further, it has been observed that increase in the concentration of Na_2SO_4 salt resulted in major damage in *S. auriculata*.

Key words: Aquatic Macrophyte, Biomass, Microscopy, Nutrients, Nitric Oxide, Photosynthetic Pigments, Proline, Salinity.

1. INTRODUÇÃO

Elevadas concentrações de sais solúveis ocorrem em ambientes terrestres ou em ambientes aquáticos e podem acontecer de forma natural ou antropogênica (Larcher, 1995). A forma natural de salinização é classificada como primária e a forma antropogênica como secundária (Williams, 1987).

A salinização primária é um processo natural que ocorre em regiões onde há um déficit de água, ou seja, baixa precipitação e um alto potencial de evaporação, ocasionando aumento progressivo na concentração de sais liberados por intemperismo ou deposição de sais pelo vento (Roache *et al.*, 2005). Ao contrário da salinização primária, a salinização secundária resulta das atividades humanas como, por exemplo, irrigação de culturas com água salina ou salobra (Neumann, 1997), a remoção da vegetação perene (Hoobs, 1993) e, no caso específico de lagoas costeiras, do processo de abertura de barreiras de areia entre o mar e as lagoas costeiras (Suzuki *et al.*, 1998; 2002).

Na região norte fluminense, os processos de intrusão de água salina/salobra nos ecossistemas aquáticos costeiros podem ocasionar processo indireto de salinização de outros corpos d'água que não apresentam contato direto com o mar, através de trocas de água pelo lençol freático. O lençol freático desta região é do tipo sub-aflorante (Dantas *et al.*, 2000), o que ocasiona intensa troca entre os ecossistemas aquáticos superficiais e o estoque de água subterrânea. Aliado a esta característica, o balanço hídrico (Chagas e Suzuki, 2005) negativo observado na região pode agravar o processo de salinização nestes ecossistemas, ocasionando alterações nas comunidades bióticas que neles se desenvolvem.

Variações ecológicas na comunidade de macrófitas aquáticas relacionadas à salinização são bem documentadas, envolvendo desde alterações na abundância, distribuição da vegetação nos ecossistemas aquáticos (Kipriyanova *et al.*, 2007; Burke e Byrne, 2009), variações no crescimento, reprodução e sobrevivência de macrófitas (Warwick and Bailey, 1997. Muschal, 2006; He *et al.*, 2010), normalmente reduzindo a riqueza de espécies (Greenberg *et al.*, 2006; Sharpe e Baldwin, 2009).

A salinidade altera a estrutura da comunidade de macrófitas aquáticas pela diminuição ou substituição das espécies sensíveis à salinidade por espécies tolerantes (Hart *et al.*, 1991). Condições ambientais variáveis podem favorecer a predominância de espécies tolerantes à salinidade no ambiente tais como a alta

fecundidade, a dormência de esporos e sementes que são capazes de ser dispersas a longas distâncias e suportam a salinidade (Anthony *et al.*, 2011).

Estudos sobre a distribuição da vegetação em ambientes aquáticos com variações de salinidade relatam que as espécies sensíveis morrem com o aumento da salinidade; as espécies relativamente tolerantes à salinidade tem os tecidos foliares e radiculares danificados, (Howard e Mendelssohn, 1999) e as espécies de plantas tolerantes podem habitar locais com salinidade elevada e moderada, e neste caso podem competir com as plantas menos tolerantes (Snow e Vince, 1984) por luminosidade, nutrientes e espaço (Peter and Burdick, 2010). Desta forma, as espécies competidoras dominantes afetam o estabelecimento das demais espécies (Zedler *et al.*, 1995). Segundo Crain *et al.* (2004) as espécies competidoras dominantes ocupam habitats fisicamente menos agressivos e deslocam as demais espécies para ambientes inóspitos. A competição interespecífica desempenha um importante papel na distribuição da vegetação ao longo do gradiente salino, entretanto, a salinidade é certamente o estresse que mais interfere no estabelecimento (Zedler *et al.*, 1995) e na distribuição das plantas nos ecossistemas aquáticos costeiros com grande variações de salinidade (Burke e Byrne, 2009).

1.1. O efeito do estresse salino nas plantas

A exposição ao estresse salino causa várias alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas devido ao excesso de íons e déficit hídrico (Greenway e Munns, 1980; Maskri *et al.*, 2010). No início ou ao longo do período de exposição das plantas à salinidade fatores fundamentais à vida da planta como o crescimento, a fotossíntese, síntese de proteínas, metabolismo lipídico, a produtividade (Parida e Das, 2005) e o equilíbrio nutricional são afetados (Grattan e Grieve, 1999). A integridade das membranas celulares e as atividades enzimáticas também são propensas à desestabilização com os efeitos tóxicos da salinidade (Zhu, 2003). Todas estas alterações podem resultar na redução da produtividade ou morte das plantas (Parida e Das, 2005).

Alguns estudos mostram que os processos de crescimento e desenvolvimento celular e os de fotossíntese são os primeiros a serem afetados pela salinidade (Munns *et al.*, 2006). O aumento da salinidade em torno das raízes das plantas induz um efeito osmótico imediato que reduz a taxa de expansão das folhas, bem como o surgimento de gemas e ramos laterais (Muuns e Tester, 2008). Esses efeitos atuam

na redução das concentrações de carboidratos (Esteves e Suzuki, 2008; Turan *et al.*, 2009) que desempenham diversas funções fisiológicas nas plantas, como o crescimento (Thompson, 2005), como fonte de carbono e energia para processos metabólicos (Taiz e Zaiger, 2009) e resistência ao estresse mecânico (Parre e Geitmann 2005).

O aumento na salinidade também promove alterações na morfologia das células foliares através da modulação da perda de água (Muuns e Tester, 2008) e a redução da condutância estomática, uma vez que em condições salinas o fechamento dos estômatos limita a perda de água pelas folhas (Yousif *et al.*, 2010). Entretanto, com o fechamento dos estômatos, a difusão do CO₂ para os cloroplastos é diminuída e assim o processo de fotossíntese pode ser inibido (Centritto *et al.*, 2003). Segundo Terry e Waldron (1984) alterações na taxa de fotossíntese influenciam a produção de biomassa que também depende de produtos de carbono gerados na fotossíntese.

Estudos tem ressaltado que quando a assimilação de CO₂ pelas plantas é reduzida pode haver a diminuição da concentração de clorofila, e diminuição no conteúdo de alguns íons essenciais, como Ca²⁺ e Mg²⁺ no mesofilo das folhas (Netondo *et al.*, 2004). Adicionalmente, a limitação da disponibilidade de CO₂ para a assimilação de carbono pela fotossíntese, também resulta no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) nos cloroplastos, que podem causar fotoinibição e fotooxidação nessas organelas (Ashraf, 2009).

Outro fator que pode alterar a fotossíntese nas plantas é a alteração na morfologia dos cloroplastos, onde ocorre a fotossíntese (Taiz e Zaiger, 2009). Os cloroplastos são muito susceptíveis a diversos fatores de estresse (Omoto *et al.*, 2009) incluindo o estresse salino que altera a estrutura dessas organelas (Rahman *et al.*, 2000; Mitsuya *et al.*, 2003; Yamane, 2003). Os mesmos autores ressaltaram em seus estudos que os principais danos aos cloroplastos causados pelo estresse salino foram o inchaço dos tilacóides e destruição do envelope do cloroplasto.

Os nutrientes, de uma forma geral tem várias funções na estrutura das plantas, no metabolismo e na osmorregulação das células vegetais (Taiz e Zeiger, 2009). No entanto, um dos principais efeitos do estresse salino em plantas é induzido por distúrbios nutricionais, que resultam do efeito da salinidade sobre a disponibilidade de nutrientes, absorção e transporte dos mesmos no interior da planta (Sairan e tyagi, 2204; Bartels e Sunkar, 2005; Munns e Tester, 2008). A deficiência de nutrientes além da toxicidade por íons e do estresse osmótico são alguns dos

fatores atribuídos ao efeito deletério da salinidade sobre crescimento e produtividade das plantas (Nublat *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2005).

De acordo com Crattan e Grieve (1992) a salinidade interrompe a aquisição de nutrientes minerais pelas plantas em duas formas. Primeiro, a força iônica do substrato, independentemente da sua composição, pode influenciar a absorção e translocação de nutrientes. O segundo mecanismo consiste na redução da absorção da disponibilidade de nutrientes por competição catiônica com os íons Na^+ e Cl^- no substrato.

Muitos estudos sobre as respostas das plantas à salinidade têm sido realizados nas últimas três décadas (Ben-Gal *et al.*, 2009), mas como as respostas e a tolerância das plantas à este estresse variam entre as espécies e de acordo com o período de tempo durante o qual as plantas foram expostas (Munns, 2002), muitos estudos ainda são necessários para elucidar como o estresse afeta o crescimento das plantas, uma vez que a hipersalinidade pode alterar a composição das espécies vegetais em ecossistemas terrestres e aquáticos afetando níveis tróficos superiores que dependem de alimento ou do habitat (Alexander e Dutton, 2006).

1.2. Tolerância à Salinidade

Tolerância das plantas à salinidade consiste na capacidade destas em completar o seu ciclo de vida sobre um substrato que contém altas concentrações de salinidade (Parida e Das, 2005). Na medida e no modo como respondem à salinidade, as plantas podem ser classificadas como halófitas ou glicófitas (Läuchi e Epstein, 1984; Zhang *et al.*, 2010). Entretanto essa classificação é considerada um pouco superficial, pois na realidade as respostas das plantas à salinidade ocorrem ao longo de um gradiente (Greenway e Munns, 1980). Entretanto, extremas concentrações salinas afetam negativamente a morfologia e fisiologia tanto de espécies halófitas quanto de glicófitas (Lokhande *et al.*, 2011).

As plantas classificadas como halófitas têm características fisiológicas e morfológicas muito bem adaptadas que lhes conferem tolerância à salinidade e lhes permitem completar o seu ciclo de vida (Flowers *et al.*, 1986) e proliferar em ambientes com altas concentrações de sal (Khan e Duke, 2001; Vernon e Bohnert, 1992). Por outro lado, as espécies classificadas como glicófitas variam em resposta à salinidade podendo ser muito sensíveis ou apresentar tolerância moderada à salinidade (Läuchi e Epstein, 1984). De acordo com Greenway e Osmond (1972), as

glicófitas podem ter o seu desenvolvimento severamente inibido por concentrações de sais toleráveis pelas plantas halófitas.

O mecanismo de tolerância à salinidade é um processo complexo (Zhu, 2000), e estudos têm mostrado que as plantas desenvolveram várias respostas bioquímicas e fisiológicas para tolerar o estresse salino (Nemoto e Sasakuma, 2002) que funcionam de modo coordenado (Yokoi *et al.*, 2002). De acordo com Parida e Das (2005), as estratégias bioquímicas e fisiológicas em resposta ao estresse salino incluem acúmulo ou exclusão seletiva de íons; controle da absorção de íons pelas raízes e dos transportes em direção às folhas; compartimentalização de íons a nível celular e da planta inteira; síntese de solutos compatíveis; mudança da via fotossintética; alteração da estrutura da membrana; indução de enzimas antioxidantes e indução de hormônios vegetais.

1.2.1. Síntese de solutos compatíveis

Para alcançar um equilíbrio iônico nos vacúolos, o citoplasma acumula compostos denominados solutos compatíveis ou osmólitos que não interferem com reações bioquímicas normais (Hasegawa *et al.*, 2000; Parida e Das, 2005). Os solutos compatíveis são moléculas neutras, não tóxicas que estabilizam proteínas e membranas prevenindo a desnaturação mediante as elevadas concentrações salinas (Yancey, 2005), e mesmo em baixas concentrações, os solutos compatíveis evitam a perda de água, o desequilíbrio iônico (Zhifang e Loescher, 2003), reduzindo a concentração intracelular de sais (Burg e Ferraris, 2008). Os solutos compatíveis acumulados no citoplasma das células de plantas sob estresse salino incluem prolina, valina, isoleucina, ácido aspártico, pinitol, betaína, glicose, frutose, sacarose, manitol, inositol (Parida e Das, 2005).

Nas plantas a prolina é um aminoácido essencial para o metabolismo primário como um componente das proteínas e é sintetizada principalmente a partir do glutamato (Szabados e Savouré, 2009). O acúmulo de prolina desempenha funções adaptativas de tolerância ao estresse (Verbruggen e Hermans, 2008) armazenando carbono e nitrogênio (Hare e Cress, 1997). O acúmulo de prolina apresenta vantagens em comparação aos outros solutos compatíveis, pois tem menos reações metabólicas além de ser um aminoácido de cadeia curta (Burg e Ferrari, 2008).

1.2.2. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, lipofílico e altamente difusível através das membranas (Crawford, 2006), sendo um versátil sinalizador celular que desempenha funções importantes nos processos fisiológicos em animais e plantas (Lamotte *et al.*, 2005). Nas plantas, o NO atua como um mensageiro intracelular envolvido em vários processos como germinação e floração, e em respostas das células vegetais a vários estresses bióticos e abióticos como defesa ao ataque por patógenos, estresse hídrico, toxicidade por metais pesados e salinidade (Leshem, 1996; Beson-Bard, 1999; Lamattina *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2008).

Nos animais, o NO é produzido primariamente pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que converte arginina, na presença de NADPH e moléculas de oxigênio, em citrulina e NO (Wendehenne *et al.*, 2001). Em plantas, proteínas vegetais com significativa similaridade bioquímica com a NOS animal foram recentemente identificadas (Guo *et al.*, 2003). O NO também pode ser produzido pela atividade da enzima nitrato redutase, reduzindo nitrito a NO com participação de NAD(P)H (Yamasaki *et al.*, 1999) e pela quebra química de doadores de NO, como o nitroprussiato de sódio (SNP) (Pedroso e Durzan, 2000). Isoladamente, o NO é uma molécula não tóxica que mesmo em altas concentrações não ocasiona morte celular (Pryor e Squadrito, 1995). Entretanto, na presença do superóxido (O_2^-), o NO torna-se um potente radical livre, com a formação de um forte oxidante, o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Ducrocq *et al.*, 1999).

A produção de NO pelas plantas varia de acordo com o desenvolvimento da planta, a intensidade luminosa e os diferentes tipos de estresse (Magalhães *et al.*, 2006), incluindo estresse por salinidade. Estudos mostram que o NO pode evitar danos oxidativos gerados pelo estresse salino tanto nas folhas (Haihua *et al.*, 2002) quanto nas raízes (Shi *et al.*, 2007) das plantas. Segundo os autores, uma baixa concentração de NO exógeno pode eliminar espécies reativas de oxigênio como $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Estudos com plantas cultivadas em condições contendo NaCl apresentaram maior produção de NO quando comparados as plantas cultivadas em condições controle, o que indica que a produção de NO aumenta em condições de salinização do ambiente (Vital *et al.*, 2008). Entretanto, a atuação do NO tem sido reportada como citotóxica ou citoprotetora, dependendo da concentração deste composto na condição em que a planta está submetida (Vital *et al.*, 2008). Adicionalmente, não se

conhece claramente como o NO atua na sinalização da planta ao estresse salino, porém estudos mostram evidências da atuação do NO na tolerância à salinidade através da ativação das proteínas H⁺-ATPase localizadas na membrana plasmática (Zhao *et al.*, 2004).

1.3. Macrófitas Aquáticas

A grande maioria dos ecossistemas aquáticos continentais do planeta apresenta características morfométricas como baixa profundidade e extensas áreas litorâneas, que colaboram para o intenso desenvolvimento da comunidade de macrófitas aquáticas (Wetzel, 1990).

De acordo com Boyd (1970) e Barko *et al.* (1986), as macrófitas aquáticas são importantes componentes de lagos, rios, reservatórios e outras coleções d'água, pois constituem significativa parcela do estoque de energia e matéria do primeiro nível trófico da rede alimentar, além de proporcionar abrigo para desova e proteção das fases jovens de organismos aquáticos, promovendo heterogeneidade espacial, que favorece a maior biodiversidade local.

Durante muitos anos as macrófitas aquáticas foram consideradas de pouca importância para o metabolismo dos ecossistemas aquáticos (Esteves, 1988). No entanto, com o aprofundamento do conhecimento, particularmente após estudos efetuados nas regiões tropicais, ficou evidenciado o seu importante papel (Pompêo, 1999). Nos ecossistemas aquáticos, as macrófitas representam uma das comunidades mais produtivas e, através de sua atividade metabólica, são capazes de produzir grandes interferências no ambiente (Esteves, 1998; Brum, 2000).

1.3.1. *Salvinia auriculata*

S. auriculata é uma macrófita aquática descrita por Aubl a partir de exemplares provenientes da Guiana, tendo ampla distribuição nativa nos neotrópicos, estendendo-se do México e Ilhas Galápagos através da América Central e Antilhas e na maior parte da América do Sul, até o Brasil (Sculthorpe, 1967). *S. auriculata* é caracterizada como uma macrófita aquática flutuante (Figura1) que pertence à família Salviniaceae.

S. auriculata pode ser utilizada como abrigo para larvas de peixes (Lacerda *et al.*, 2010), para tratamento de efluentes da piscicultura (Soares *et al.*, 2008), e como bioindicadores de poluição em ecossistemas aquáticos (Suñe *et al.*, 2007). A

biomassa de *S. auriculata* pode ser utilizada como biofertilizante ou alimentos para gados (Toledo e Penha, 2011). Entretanto sob condições favoráveis *S. auriculata* possui habilidade de colonizar muito rapidamente ambientes aquáticos através de propagação vegetativa e desta forma pode se proliferar de forma inadequada causando prejuízo aos múltiplos usos dos mesmos (Peixoto *et al.*, 2005).



Figura 1: *Salvinia auriculata*. www.elacuario.org

As proliferações indesejadas desses vegetais podem proporcionar condições desfavoráveis para outras espécies, que deixam de exercer uma pressão competitiva sobre ela (Thomaz e Bini, 2003). Segundo Tundisi e Tundisi (2008), o crescimento excessivo de algumas macrófitas também pode comprometer importantes atividades como a pesca, a navegação e o potencial de produção hidrelétrica (Tundisi e Tundisi, 2008). Desta forma, o conhecimento sobre os limites de tolerância de macrófitas aquáticas é de grande importância para que seja possível o manejo adequado caso ocorra uma proliferação indesejada de algumas espécies em ecossistemas aquáticos.

Atualmente são poucos os estudos referentes aos aspectos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos associados as respostas de *S. auriculata* à salinidade nos ecossistemas aquáticos costeiros. A avaliação sobre o estresse salino em *S. auriculata* na região norte fluminense é destacado, visto que na literatura científica esta macrófita aquática é tida como intolerante à salinidade e, no entanto, em muitos dos sistemas aquáticos desta região que apresentam salobridade observa-se o desenvolvimento e alta proliferação desta espécie.

Esta pesquisa procurou aprofundar-se no conhecimento do desenvolvimento, morfologia e qualidade da biomassa de *S. auriculata* sob a influência de diferentes concentrações dos sais NaCl e Na₂SO₄, uma vez que a toxicidade nas plantas resulta principalmente de altas concentrações dos íons Na⁺, Cl⁻, SO₄ (Chinnusamy e Zhu, 2003).

2. Hipótese

Este estudo testou a hipótese que *S. auriculata* apresenta mecanismos de tolerância à salobridade como: incremento no conteúdo de prolina e produção de óxido nítrico. Esta tolerância pode explicar o seu desenvolvimento e grande proliferação em ambientes costeiros da Região Norte Fluminense. Entretanto, de acordo com a literatura científica *S. auriculata* não é tolerante às elevadas concentrações salinas.

3. Objetivos

Os objetivos gerais do presente trabalho foram investigar os efeitos dos sais NaCl e Na₂SO₄ sobre a anatomia e ultraestrutura foliar, aspectos bioquímicos, pigmentos fotossintetizantes e teor de nutrientes da macrófita aquática *S. auriculata*. Estes dados podem vir a subsidiar planos de manejo de macrófitas aquáticas que crescem abundantemente nos ecossistemas aquáticos na região norte fluminense.

Os objetivos específicos foram:

- 1- Avaliar a anatomia e ultraestrutura foliar de *S. auriculata* após a salinização.
- 2- Realizar ensaios bioquímicos (prolina e produção de NO) para avaliação de respostas de tolerância da macrófita à salinidade.
- 3- Avaliar alterações no teor de pigmentos fotossintetizantes e nutrientes (Ca, Cl, K, Mg, N, Na, P, S).

Capítulo 1

Efeito do NaCl sobre a biomassa, morfologia e fisiologia de
Salvinia auriculata Aubl.

Resumo

Salvinia auriculata é uma macrófita aquática flutuante com ampla distribuição nos sistemas aquáticos da região Norte Fluminense. Essa macrófita tem grande capacidade de colonizar ambientes eutrofizados e ultimamente tem sido encontrada em regiões alagadas próximas a costa. Este estudo teve como objetivo avaliar a tolerância de *Salvinia auriculata* à salinidade induzida por NaCl e para isto foi investigado o efeito de diferentes concentrações do sal NaCl sobre o conteúdo nutricional Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , N e P, teor pigmentos fotossintéticos, teor de prolina e produção de NO de *Salvinia auriculata* Aubl. As plantas foram coletadas manualmente na lagoa do Jacú no Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, e após um período de aclimação foram realizados experimentos em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 20 °C noturno e 25 °C diurno e concentrações de 0, 50 mM, 100 mM e 150 mM de NaCl. Após cinco dias de experimento foi verificado o decréscimo do conteúdo nutricional com exceção do N. Os teores de clorofila *b* e clorofila total diminuíram e os teores de clorofila *a*, razão clorofila *a*/ clorofila *b* e carotenóides aumentaram. A biomassa das plantas submetidas ao tratamento com 50 mM do sal aumentou quando comparado a biomassa das plantas submetidas aos demais tratamentos. O teor de prolina aumentou significativamente nas plantas submetidas ao tratamento com 150 mM. A produção de NO extracelular e intracelular foi maior nas plantas com duas horas de incubação do que nas plantas com cinco dias de incubação na solução com as diferentes concentrações salinas. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que *Salvinia auriculata* é tolerante à baixa salinidade e conseqüentemente é capaz de se desenvolver em ambientes aquáticos salobros.

Palavras Chave: *Salvinia auriculata*, nutrientes, pigmentos fotossintéticos, prolina, NO.

1. Introdução

A salinidade é um importante fator ambiental que afeta o crescimento e a produtividade das plantas (Urano *et al.*, 2010; Vysotskaya *et al.*, 2010). Nos corpos aquáticos costeiros, a salinidade pode variar sazonalmente e ser influenciada por alterações do nível do mar, precipitação, evaporação (Schallenberg *et al.*, 2003), alterações hidrológicas como construções de canais (Howard e Mendelssohn., 1999) e atividades antropogênicas (Roache *et al.*, 2006). De uma forma geral, o estresse salino geralmente é induzido especialmente pelo NaCl (Doganlar *et al.*, 2010).

O sódio atua na ativação de uma ampla gama de enzimas nas plantas, e está envolvido na osmose da membrana e pode substituir o K^+ em algumas funções metabólicas e osmóticas (Fernandes, 2006). O Cl^- desempenha um papel importante na fotossíntese, na ativação enzimática, na regulação osmótica e na divisão celular (Esna-Ashari e Gholami, 2010). No entanto, o aumento excessivo da concentração de Na^+ e Cl^- afeta a absorção de muitos nutrientes indispensáveis as planta, através de interações competitivas, afetando a seletividade iônica das membranas (Stoeva e Kaymakanova, 2008), e a atividade fotossintética das plantas (Parida *et al.*, 2002), pois reduzem a abertura dos estômatos conduzindo à uma redução de CO_2 intracelular (Munns e Tester, 2008). A salinidade em altas concentrações também altera o equilíbrio iônico, causando estresse hiperosmótico e toxicidade (Niu *et al.*, 1995), além do acúmulo de osmoprotetores como prolina, por exemplo (Bohnert *et al.*, 1995).

Um composto que tem sido recentemente proposto na mediação da resposta à salinidade é o óxido nítrico (NO) (López-Carrión *et al.*, 2008). O NO é um radical livre gasoso que atua como uma molécula de sinalização em muitas espécies (Delledonne *et al.*, 1998), e está envolvido em diversos processos fisiológicos nas plantas, incluindo respostas adaptativas aos estresses biótico e abiótico, ao crescimento radicular, ao fechamento dos estômatos (Neill *et al.*, 2003; Desikan *et al.*, 2004; Delledonne, 2005). O NO é capaz de diminuir os efeitos tóxicos dos fatores abióticos como a salinidade, a seca, o calor e o estresse mecânico (Lamattina *et al.*, 2003).

Salvinia auriculata é uma macrófita aquática flutuante que sob condições favoráveis coloniza extensas superfícies de água em pouco tempo (Peixoto *et al.*, 2005). Neste sentido, esta espécie pôde ser utilizada em estudos que envolveu efeitos de estresse salino, para melhor entender o estresse e seus efeitos no

desenvolvimento da espécie. Desta forma, este estudo teve como objetivo investigar o efeito do estresse salino induzido por NaCl sobre a biomassa, fisiologia e morfologia de *S. auriculata*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Solução nutritiva

As soluções de cultivo de micronutrientes e macronutrientes foram preparadas de acordo com Hoagland e Arnon (1938) e Smart e Barko (1985) modificada, como descritas nas tabelas 1 a 3.

Tabela 1: Reagentes utilizados no preparo da solução nutritiva de micronutrientes de Hoagland e Arnon (1938).

Solução	Reagentes	Massa (g)	Volume da solução (mL)	* Volume das alíquotas para solução estoque (mL)
micronutrientes	MnSO ₄ .2H ₂ O	1,191	100	10
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,161	100	10
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,052	100	10
	H ₃ BO ₃	1,972	100	10
	NH ₄ Mo7O ₂₄ .4H ₂ O	0,121	100	10

Para obter-se a solução estoque adicionou-se alíquotas de 10ml de cada estoque individual a um volume de 950 ml de água Milli-Q. Na solução final utilizou-se 14ml da solução estoque por litro.

A solução estoque de Ferro+EDTA foi preparada separadamente (400 ml de cada solução). As duas soluções individuais foram misturadas e o volume completado com água Milli-Q para 1000 ml. Para cada litro da solução final utilizou-se 1ml da solução Fe+EDTA.

Tabela 2: Reagentes utilizados no prepara da solução Ferro+EDTA.

Solução	Reagentes	Massa (g)	Volume da solução (mL)	Volume na solução final (mL/L)
Fe+ EDTA	FeCl ₃	11,91	400	1
	EDTA	5,19	400	1

Para obtenção da solução de cultivo de Smart e Barko (1985) modificada, as soluções estoques de cada macronutriente foram preparadas individualmente. Essas soluções estoques foram adicionadas separadamente em cada unidade experimental.

Tabela 3: Reagentes utilizados para o preparo da solução macronutrientes Smart e Barko (1985) modificada.

Solução	Reagentes	Massa (g)	Volume da solução (mL)	Volume na solução final (mL/L)
Macronutrientes	CaCl ₂ .2H ₂ O	9,17	100	1
	MgSO ₄ .7H ₂ O	34	500	1
	NaHCO ₃	29,2	500	1
	KHCO ₃	7,7	500	1
	NH ₄ NO ₃	80,5	1000	5
	KH ₂ PO ₄	136,1	1000	1

2.2. Amostragem

Para realização deste estudo foram coletados indivíduos de *S. auriculata* na lagoa do Jacú localizada na Br 356 no Parque Cidade Luz no Município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. A lagoa do Jacú é considerada uma lagoa de água doce com condutividade (~485uS/cm).

As plantas foram transportadas em caixas plásticas (Figura 1) para o Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade do Norte Fluminense, onde foram lavadas em água corrente para retirada de materiais orgânicos ou inorgânicos aderidos. As plantas foram armazenadas em caixas plásticas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) e Smart e Barko (1985) modificada. Após um período de cinco dias de aclimatação em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, 50 g das macrófitas foram acondicionadas em unidades experimentais com 3 litros de solução nutritiva de micro e macronutrientes. O experimento foi realizado em câmara de germinação sob 20°C durante 12 horas de escuro e 25°C horas com 12 horas claras (100 umol de fótons/m⁻².s⁻¹) utilizando-se as concentrações 0, 50, 100 e 150 mM de NaCl (Merck), em triplicatas para cada condição. Após cinco dias de incubação, foram obtidos os pesos do material vegetal fresco (PF) para avaliar a variação de biomassa, e cerca de 5 g de amostras frescas de *S. auriculata* foram separadas para as avaliações de NO, pigmentos fotossintéticos e prolina. O restante das amostras

foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa de circulação de ar à temperatura de 60 °C, durante 4 dias. Após esse período de secagem as amostras foram pesadas para obtenção do peso seco (PS), e em seguida trituradas em moinho de facas para determinação de nutrientes.



Figura 1: *Salvinia auriculata* obtidas na lagoa e acondicionada em caixa para transporte ao Laboratório de Ciências Ambientais – LCA/CBB/UENF.

2.3. Determinação de Nutrientes

Após a trituração do material vegetal seco 0,5 g das amostras foram utilizadas para a quantificação de Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- e P de acordo com as metodologias descritas por Malavolta *et al.* (1997). A determinação de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica (AAS-ZEISS). A determinação de N foi realizada pelo método Nessler (Jackson, 1965) após a digestão sulfúrica, utilizando-se 0,1 g do material vegetal seco. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância a 480 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de P total foi obtido por digestão de 0,5 g material vegetal seco com ácido nítrico e perclórico e posterior quantificação por colorimetria pelo método molibdato. O Cloreto foi determinado no extrato aquoso por titulação com nitrato de prata Malavolta *et al.* (1997).

2.4. Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos

A extração dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Wellburn (1994). As amostras de folhas de *S. auriculata* (0,2 g cada) foram cortadas em tiras, e acondicionadas em

tubos de plástico rosqueáveis contendo 5 mL do solvente orgânico DMSO (dimetilsulfóxido) envoltos em papel alumínio. As determinações das concentrações dos pigmentos foram realizadas utilizando-se alíquotas de 1 ml de cada amostra obtidas da solução de extração com DMSO submetidas a leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm em espectrofotômetro (UV-160A Shimadzu).

2.5. Determinação do conteúdo de Prolina

O teor de prolina foi obtido de acordo com o método de Bates *et al.* (1993). Amostras de folhas e raízes frescas (0,3 g), separadamente, foram maceradas com 6 ml de ácido sulfosalicílico 3%, em gelo. Em seguida, os extratos foram acondicionados em tubos falcon de 15 mL e centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos. Após este procedimento foi realizada a transferência de 1 mL do sobrenadante para outro tubo falcon de 15 mL e adicionado 1 mL de solução de nihidrina ácida (2,5% de nihidrina + 60% de ácido fosfórico), 1 mL de ácido acético glacial (100% PA). Após, as amostras foram incubadas em banho-maria em fervura, por uma hora. Em seguida, as amostras foram resfriadas rapidamente em gelo e a leitura da absorbância realizada em 518 nm em espectrofotômetro (UV-160A Shimadzu).

2.6. Quantificação da Produção de NO

Avaliou-se o conteúdo de NO em plantas de *S. auriculata* por microscopia de fluorescência e por fluorometria. Pelo fato do NO ser um mensageiro secundário, atuando como um sinalizador em diversos processos nos vegetais, a sua quantificação foi realizada com 2 horas e 5 dias de incubação nos diferentes tratamentos, visando identificar o comportamento da resposta no acúmulo deste composto nesta espécie.

Para a visualização de NO endógeno, segmentos de raízes foram isolados das plantas e incubados em placas de cultura de 12 poços (10 segmentos/poço), contendo os respectivos tratamentos 0, 50, 100 e 150 mM de NaCl (1 mL/poço). As análises foram realizadas após duas horas e cinco dias de incubação nestes tratamentos. Para identificar a produção endógena de NO nos diferentes tratamentos por microscopia de fluorescência, as raízes foram tratadas com 15 μ M da sonda fluorescente 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-FM-DA;

Calbiochem), um indicador de NO permeável à membrana plasmática, conforme descrito por Laxalt *et al.* (2007). As amostras permaneceram incubadas nos diferentes tratamentos por duas horas a 25°C, sob agitação 90 rpm, na luz. O controle negativo foi realizado incubando-se raízes sem a sonda de marcação. Em seguida, as raízes foram lavadas três vezes com o respectivo meio de incubação, e foram montadas em lâminas para a visualização em microscópio de fluorescência Axioplan – Zeiss (Carls Zeiss, Jena, Germany), adaptado com câmera digital AxioCam MRc5, com software AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany). Utilizou-se filtros com comprimento de onda de excitação a 495 nm e emissão a 515 nm para o indicador DAF-FM-DA. A intensidade de fluorescência das raízes foi determinada com o software AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany), e os dados foram apresentados em Fluorescência por área (μm^2).

A quantificação do NO extracelular, liberado pelas plantas de *S. auriculata*, foi realizada por fluorometria. Para tanto, plântulas (200 mg) foram incubadas nos diferentes tratamentos com NaCl (0, 50, 100 e 150 mM) em placas de cultura de 12 poços (3 plantas/poço, com 3 mL/poço). As análises foram realizadas após 2 horas e 5 dias de incubação nestes tratamentos. Para identificar a liberação de NO extracelular nos diferentes tratamentos, as plantas foram tratadas por 2 horas com 10 μM da sonda fluorescente diaminofluoresceína (DAF-FM; Calbiochem), um indicador de NO impermeável à membrana plasmática. O controle negativo foi realizado incubando-se as plantas em meio de incubação sem a sonda de marcação. Após duas horas de incubação, foram coletados 2 mL do meio de incubação e a quantidade de NO foi mensurada em espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC utilizando-se filtros com comprimento de onda de excitação a 495 nm e emissão a 515 nm para o indicador DAF-FM. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições.

2.7. Análise Estatística

Com exceção dos resultados do conteúdo de NO extracelular e intracelular que foram analisados pelo teste estatístico de Análise de variância Two Way com o teste a posteriori de Bonferroni, os demais dados obtidos foram analisados utilizando-se o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis com o teste a posteriori de Dunn para comparação dos resultados entre os tratamentos, adotando o nível de significância de 0,05.

3. Resultados

A Figura 2 mostra os seguimentos de *S. auriculata* após cinco dias de incubação com as diferentes concentrações de NaCl. Nos tratamentos salinos foi verificado alteração na coloração, especialmente na maior concentração (150 mM).



Figura 2: Aspectos morfológicos de plântulas de *S. auriculata*, incubadas com 0 (Fila 1), 50 (Fila 2), 100 (Fila 3) e 150 mM (Fila 4) de NaCl, em placa de cultura de 12 poços.

Em relação aos pigmentos (Tabela 4), verificou-se que o teor de clorofila *a* foi maior nas plantas submetidas ao tratamento salino com 50mM de NaCl. Nas concentrações salinas mais elevadas (100 e 150 mM) o teor de clorofila *a* diminuiu em relação à 50 mM de NaCl. O teor de clorofila *b* nas plantas diminuiu com os tratamentos salinos e houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as plantas submetidas ao tratamento controle e 150 mM de NaCl. A razão entre o teor de clorofila *a* e clorofila *b* aumentou com os tratamentos salinos, principalmente nas plantas submetidas ao tratamento com 50mM de NaCl. O teor de clorofila total (Clorofila *a* + clorofila *b*) não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, observou-se uma tendência ao decréscimo destes pigmentos com o aumento da concentração salina. Por outro lado, o teor de carotenóides aumentou significativamente com o aumento da salinidade, sendo observada diferença estatística significativa entre as plantas submetidas ao tratamento controle e 150 mM de NaCl.

Tabela 4: Teor de clorofila *a* e *b*, clorofila total e carotenóides [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS] de *Salvinia auriculata* incubadas com NaCl, durante 5 dias. Entre parênteses estão os valores mínimos e máximos. Letras diferentes, para cada pigmento analisado, indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos pelo teste de Dunn.

NaCl [mM]	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a/b</i>	Clorofila total	Carotenóides
0	18,17 b (18,29 - 19,75)	13,38 a (13,02 - 16,11)	1,4 b (1,13 - 1,52)	32,7 a (31,66 - 34,28)	1,83 a (1,62 - 2,34)
50	24,62 a (22,89 - 24,62)	9,18 ab (7,55 - 9,79)	2,7 a (2,61 - 3,03)	33,8 a (30,44 - 35,35)	4,49 ab (4,05 - 4,66)
100	21,26 ab (20,31 - 21,33)	9,18 ab (8,21 - 9,71)	2,2 ab (1,87 - 2,59)	29,5 a (31,04 - 31,15)	4,63 ab (4,07 - 5,23)
150	19,69 ab (18,78 - 20,54)	8,20 b (7,24 - 8,43)	2,5 ab (2,34 - 2,59)	28,1 a (26,01 - 28,74)	5,50 b (5,01 - 5,54)

A Figura 3 refere-se ao PF e PS das plantas após cinco dias de incubação nas diferentes concentrações de NaCl. As plantas submetidas ao tratamento salino com 50 mM de NaCl tiveram maior incremento de PF e PS quando comparadas aos demais tratamentos. A perda de biomassa ocorreu nas plantas sob os tratamentos com 100 mM e 150 mM de NaCl. O teste estatístico indicou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos com 50 e 150 mM de NaCl, tanto nos resultados de PF quanto nos resultados de PS.

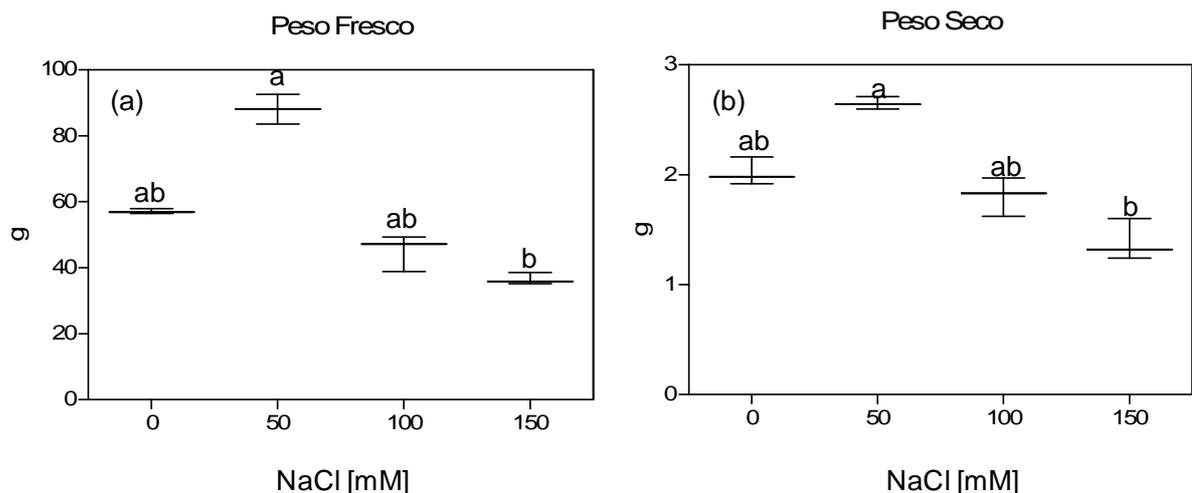


Figura 3: Alterações no peso fresco (PF) (a) e peso seco (PS) (b) de *S. auriculata* incubados com diferentes concentrações de NaCl, durante 5 dias. As barras horizontais indicam a mediana e as barras verticais indicam os valores mínimos e máximos. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos pelo teste de Dunn.

Na tabela 5 estão descritas as variações dos conteúdos de nutrientes em *S. auriculata* após 5 dias de incubação com as concentrações de 0 (controle), 50, 100 e 150 mM de NaCl, em câmara de germinação. Observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) para os conteúdos de Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- e a razão Na^+/K^+ entre os tratamentos controle (0) e 150 mM de NaCl. Os conteúdos de Ca^{2+} , K^+ e Mg^{2+} diminuíram com o aumento da concentração de NaCl enquanto para N e P não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos salinos. Embora não tenha apresentado diferenças estatísticas significativas, os resultados mostram uma maior concentração de N no tratamento com 50 mM e uma tendência progressiva ao decréscimo dos conteúdos de P com o aumento da salinização. Verificou-se uma tendência ao aumento da razão Na^+/K^+ , devido ao aumento da concentração de Na na solução nutritiva. Os conteúdos de K^+ foram os mais afetados quando comparados aos demais nutrientes, apresentando uma maior redução com o aumento da concentração salina.

Tabela 5: Conteúdo de nutrientes [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS] em plantas de *Salvinia auriculata* incubadas com 0, 50, 100 e 150 mM de NaCl, durante 5 dias. Entre parênteses estão os valores mínimos e máximos. Letras diferentes, para cada nutriente, indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos pelo teste de Dunn.

NaCl [mM]	Ca	K	Na ⁺ /K ⁺	Na	Mg	Cl	N	P
0	11,32 a (10,67 - 12,80)	22,41 a (21,18 - 23,14)	0,29 a (0,29 - 0,29)	6,52 a (6,12 - 7,16)	3,16 a (2,54 - 3,43)	1,71 a (1,71 - 2,10)	27,15 a (26,66 - 27,58)	3,84 a (3,39 - 3,90)
50	7,08 ab (6,93 - 7,23)	18,19 ab (17,62 - 20,22)	1,44 ab (1,32 - 1,60)	26,78 ab (26,26 - 28,10)	1,73 ab (1,65 - 1,82)	4,27 ab (3,83 - 4,31)	28,17 a (28,08 - 30,16)	3,56 a (3,40 - 3,81)
100	6,03 ab (5,42 - 6,13)	7,92 ab (7,59 - 9,37)	4,81 ab (4,23 - 5,52)	41,84 ab (38,07 - 39,63)	1,06 ab (1,05 - 1,17)	4,58 ab (4,38 - 5,06)	27,91 a (27,02 - 28,70)	3,48 a (3,12 - 3,64)
150	5,05 b (4,86 - 5,93)	3,95 b (3,62 - 4,44)	11,51 b (9,99 - 12,18)	44,33 b (44,03 - 45,41)	0,81 b (0,76 - 0,93)	5,12 b (4,97 - 7,01)	27,94 a (27,86 - 29,05)	3,40 a (3,18 - 3,76)

O conteúdo de Prolina (Figura 4) em *S. auriculata* aumentou significativamente no tratamento salino com 150 mM de NaCl quando comparado às plantas controle. Nas concentrações de 50 e 100 mM de NaCl as plantas apresentaram uma tendência ao aumento no teor de prolina, entetanto não houve diferenças significativas.

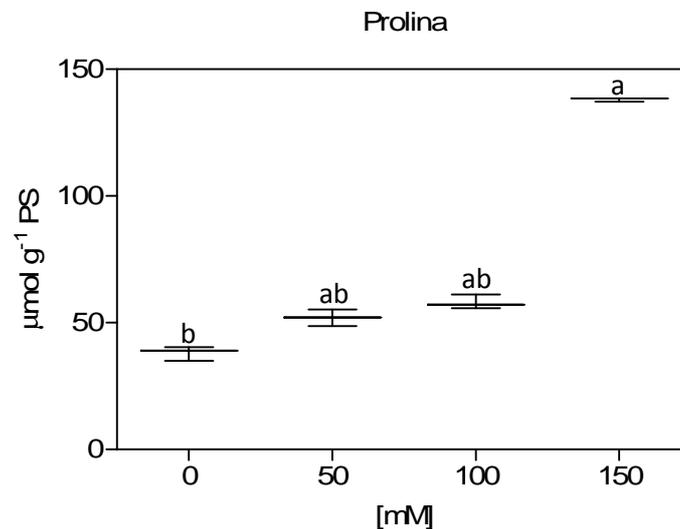


Figura 4: Conteúdo de prolina em *S. auriculata* incubadas com NaCl, durante 5 dias. As barras horizontais indicam a mediana e as barras verticais indicam os valores mínimos e máximos. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos pelo teste de Dunn.

Na Figura 5 estão representados o conteúdo extracelular de NO liberado por *S. auriculata* após por duas horas (Figura 5a) e cinco dias (Figura 5b) de incubação com as diferentes concentrações de NaCl.

Após 2 horas de incubação verificou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as plantas submetidas aos tratamentos controle, 100 e 150 mM de NaCl, observando-se um aumento no conteúdo de NO extracelular com o aumento da concentração salina (Figura 4a).

Por outro lado, após cinco dias de incubação (Figura 5b) verificou-se diferença significativa entre os tratamentos controle e 100 mM de NaCl, e uma tendência ao decréscimo de NO extracelular nas plantas submetidas a todos os tratamentos salinos quando comparados ao controle.

Verificou-se que as plantas submetidas ao tratamento controle e ao tratamento com 50 mM de NaCl não apresentaram diferenças significativas quando comparados os tempos de incubação para o conteúdo extracelular de NO, porém os resultados mostram uma tendência em aumentar após duas horas de incubação e um

decréscimo de NO extracelular após cinco dias de tratamento no tratamento com 50 mM.

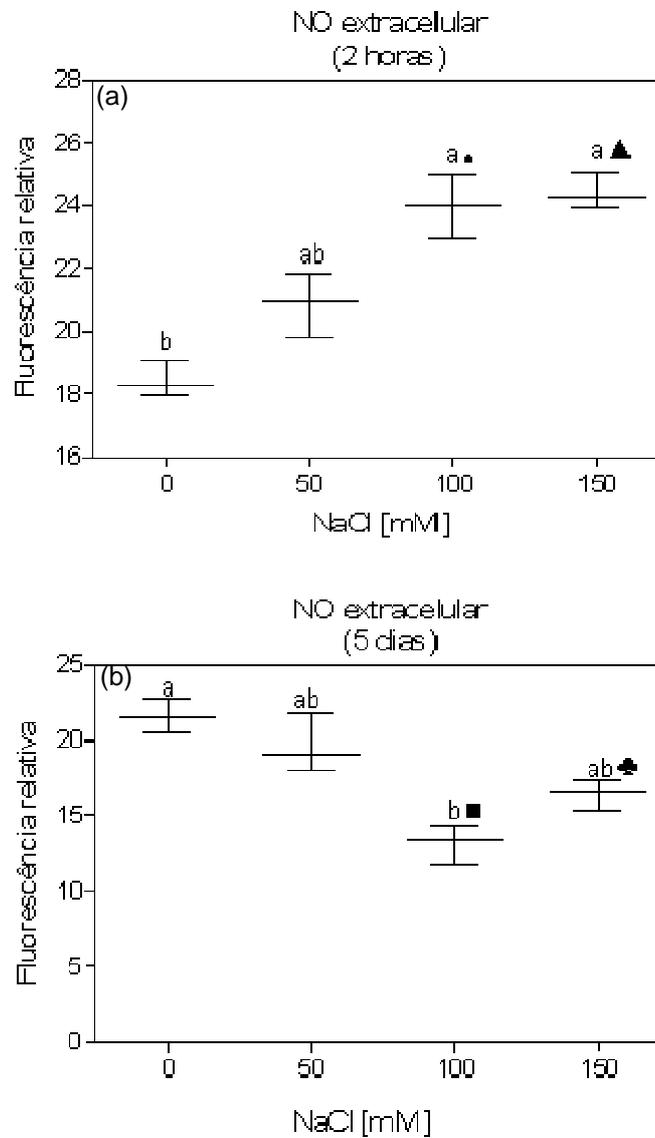


Figura 5: Conteúdo extracelular de NO em plantas de *S. auriculata* após 2 horas (a) e 5 dias de incubação (b). As barras horizontais indicam a mediana e as barras verticais indicam os valores mínimos e máximos. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos salinos e os símbolos indicam diferenças estatísticas entre os tempos pelo teste de Bonferroni.

Em relação ao conteúdo intracelular de NO, pela análise por microscopia de fluorescência, verificou-se após duas horas de incubação uma maior concentração de NO endógeno nas raízes de *S. auriculata* submetidas ao tratamento com 50 mM

de NaCl (Figura 6c), quando comparado aos tratamentos controle e 100 e 150 mM de NaCl (Figuras 6 a,e,g).

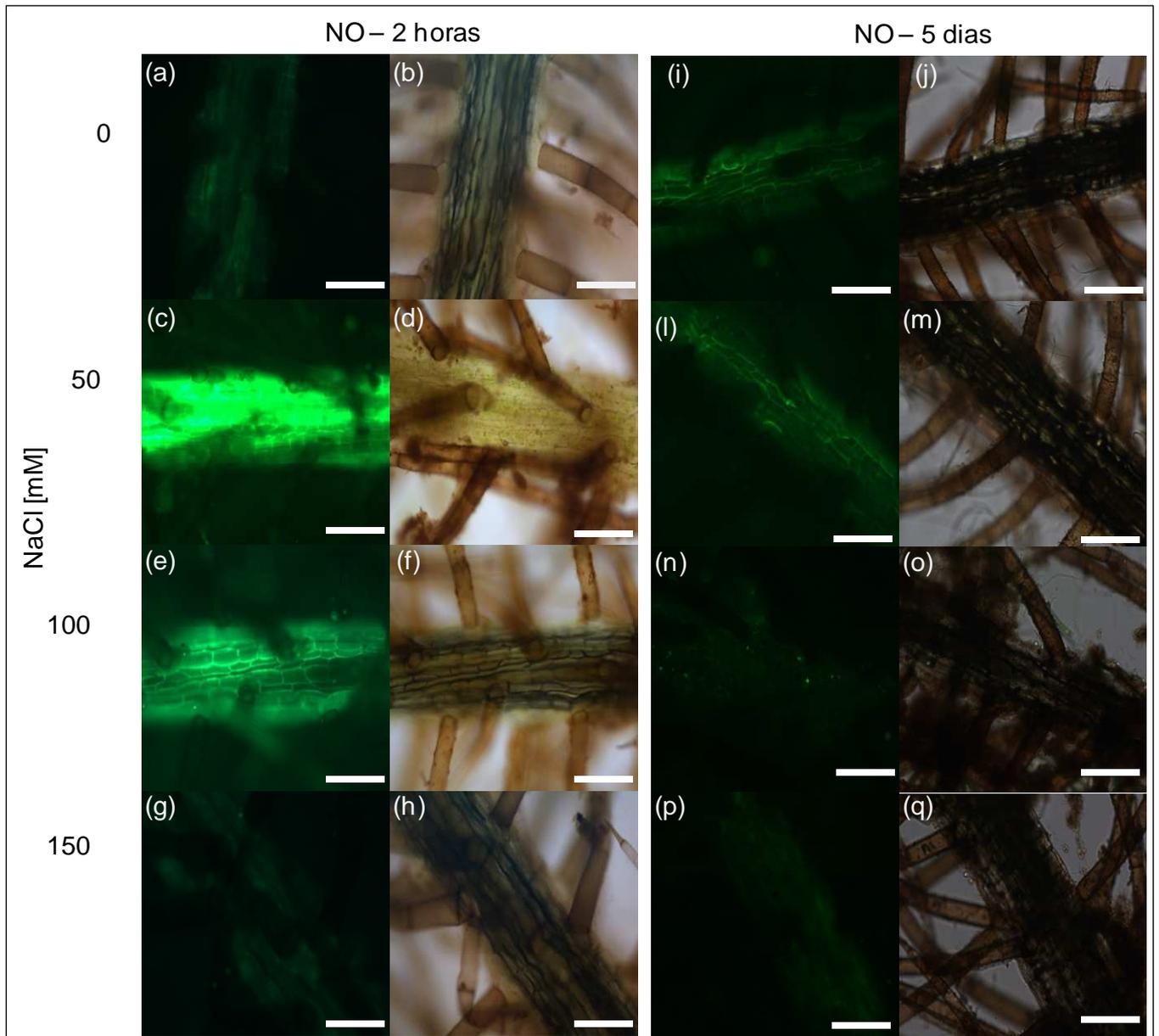


Figura 6: Microscopia de fluorescência do conteúdo endógeno de NO em raízes de *S. auriculata* após 2 horas (a-h) e 5 dias (i a g) de incubação nos diferentes tratamentos com NaCl. Barras = 200 μ m.

As raízes incubadas durante cinco dias nos diferentes tratamentos apresentaram respostas semelhantes entre si, com pouca variação entre os tratamentos observada pela redução na fluorescência de NO (Figuras 6i-q) quando comparadas as plantas que permaneceram incubadas por duas horas (Figura 6a-g). A partir das imagens da

microscopia de fluorescência foram obtidas as intensidades da fluorescência de NO endógeno das raízes submetidas aos diferentes tratamentos salinos (Figura 7a e b).

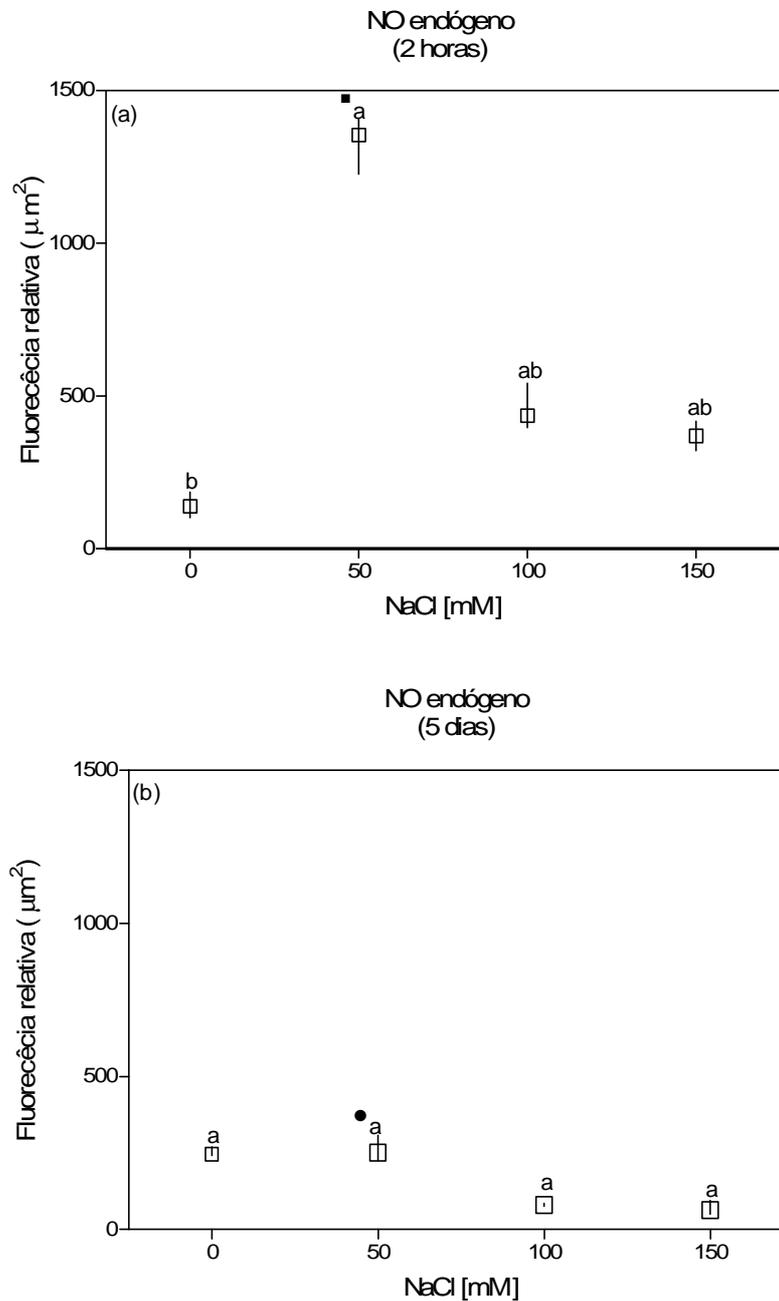


Figura 7: Fluorescência relativa (μm^2) de NO endógeno em raízes de *S. auriculata* após 2 horas (a) e 5 dias (b) de incubação nas diferentes concentrações de NaCl. Dados correspondem à mediana e as barras verticais indicam os valores mínimos e máximos. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e os símbolos indicam diferenças estatísticas entre os tempos pelo teste de Bonferroni.

Verificou-se a partir destes dados que o período de duas horas de incubação induziu maior síntese de NO nas plantas do que o período de cinco dias (Figura 7a).

Após o período de duas horas de incubação, as raízes das plantas submetidas ao tratamento controle apresentaram menor quantidade de NO endógeno quando comparadas aos tratamentos salinos, sendo que a diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi observada entre as plantas submetidas ao tratamento controle e 50 mM de NaCl.

Após o período de cinco dias de incubação (Figura 7b), não foram evidenciadas diferenças significativas no conteúdo endógeno de NO entre os tratamentos. Entretanto, as plantas submetidas às maiores concentrações salinas apresentaram uma tendência à diminuição da densidade da fluorescência relativa do NO quando comparada às raízes submetidas aos tratamentos controle (0) e 50 mM de NaCl.

4. Discussão

Inúmeros estudos têm comprovado alterações bioquímicas e morfológicas em plantas submetidas ao estresse salino (Greenway e Munns, 1980; Grattan e Grieve, 1999; Parida e Das, 2005; Maskri *et al.*, 2010). As plantas expostas a alta salinidade apresentam sintomas de lesões foliares e de mudanças na coloração (Ndakidemi e Makoi, 2009). O Na^+ e Cl^- podem causar injúrias nas folhas das plantas, mas os sintomas de Cl^- geralmente aparecem em primeiro lugar (Kozłowski, 1997). Morfologicamente, verificou-se que as folhas de *S. auriculata* apresentaram diferenças na coloração quando submetidas às maiores concentrações (100 e 150 mM) de NaCl (Figura 2). Isto deve ter ocorrido pelo excesso de Cl^- , que pode ter ocasionado o aparecimento de clorose, seguida por uma coloração bronze que pode ter evoluído para necrose foliar (Fernandes, 2006), especialmente nas plantas sob o tratamento de 150 mM de NaCl.

A clorofila é o principal agente responsável pela fotossíntese e sob circunstâncias adversas, a concentração total de pigmentos é um bom indicador da atividade fotossintética (XinWen *et al.*, 2008). Desta forma, pode-se inferir que a taxa fotossintética de *S. auriculata* tenha diminuído com as concentrações mais altas de salinidade avaliadas, uma vez que a concentração de pigmentos totais apresentou diminuição com o incremento de salinidade (Tabela 4), corroborando com outros trabalhos (Centritto *et al.*, 2003; Netondo *et al.*, 2004). A maioria dos estudos sobre plantas submetidas à diferentes concentrações de salinidade tem como resultado o decréscimo dos pigmentos fotossintéticos (Jampeetong e Brix 2009; Aghaleh *et al.*, 2009; Chaves *et al.*, 2009). Em contrapartida alguns estudos ressaltam que os

efeitos da salinidade sobre os componentes fotossintéticos, como enzimas, clorofilas e carotenóides dependem da intensidade e do tempo de duração do estresse (Lakshmi *et al.*, 1996; Misra *et al.*, 1997) e da espécie vegetal em análise (Dubey, 1994).

No presente trabalho os resultados mostraram o aumento do teor de clorofila *a*, carotenóides e da razão clorofila *a*/clorofila *b* com o aumento da salinidade, enquanto que o teor de clorofila *b* diminuiu (Tabela 2). O teor de clorofila total assim como o PF e PS foram maiores nas plantas submetidas à concentração de 50 mM de NaCl, enquanto nos demais tratamentos salinos observou-se uma tendência ao decréscimo quando comparados ao controle. Neste sentido, estes resultados sugerem que a concentração de 50 mM de NaCl estimulou o desenvolvimento e crescimento de *S. auriculata*.

De acordo com Houimli *et al.* (2010) o estresse por NaCl modifica o teor de clorofila *b* mais do que o teor de clorofila *a* que parece ser menos sensível ao estresse por NaCl. Isto implica no aumento da razão de Clorofila *a* / Clorofila *b* que também pode ser justificado pelo fato de que o primeiro passo na degradação da clorofila *b* implica na sua conversão em clorofila *a* (Fang *et al.*, 1998).

Alguns estudos mostraram que a reação de formação da clorofila *a* a partir da clorofila *b* é um processo envolvido na reorganização do aparelho fotossintético durante a aclimação em ambientes com luminosidade diferentes (Tanaka *et al.*, 1981; Tanaka *et al.*, 1991; Ohtsuka *et al.*, 1997). Isto também pode ter contribuído para o aumento da clorofila *a* e redução do teor de clorofila *b* no presente estudo, uma vez que a luminosidade presente na lagoa de origem da macrófita *S. auriculata* é maior do que a luminosidade da câmara de germinação onde foram mantidas as plantas durante a realização do experimento. De acordo com Scheumann *et al.* (1998) a única diferença entre as estruturas da clorofila *a* e *b* está localizada em Carbono 7, formado por um grupo formil na clorofila *b* e um grupo metil na clorofila *a*. Desta forma, as alterações no teor de clorofila *a* e *b* afetaram o teor de clorofila total que reduziu, assim como no estudo realizado com *Salvinia molesta* e *Pistia stratiotes* submetidas à salinidade com NaCl (Upadhyay e Panda, 2005).

O aumento do teor de carotenóides nas plantas submetidas à salinização ocorreu provavelmente porque os carotenóides podem atuar como agentes antioxidantes (Edge *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2000) protegendo as membranas lipídicas do estresse oxidativo gerados nas plantas expostas à salinidade (Falk e Munné-Bosch,

2010). Em um estudo realizado com plantas de arroz submetidas à salinidade também foi encontrado um aumento no teor de carotenóides (Misra *et al.* 1997).

A salinidade afeta a produção de biomassa e peso nas plantas (Egan e Ungar 2001; Stoeva e Kaymakanova, 2008). A redução da biomassa vegetal pode ocorrer devido a uma combinação de desaceleração do crescimento e desenvolvimento como resultado induzido pelo estresse osmótico (Shani e Ben-Gal, 2005). O peso fresco e peso seco de *S. auriculata* aumentam na concentração de 50 mM de NaCl e decresceu nos demais tratamentos salinos (Figura 2). Os resultados obtidos para pigmentos fotossintéticos e biomassa de *S. auriculata* em resposta à variação de salinidade indicam que as áreas alagáveis costeiras oligohalinas podem ser amplamente colonizadas por esta espécie. Isto ocorre devido à tolerância de *S. auriculata* à salinidade moderada que permite a essa planta tornar-se daninha, possivelmente pela capacidade de adaptação desta espécie nestas condições via alterações fisiológicas e bioquímicas.

Em relação às variações nas concentrações de nutrientes em resposta à variação de salinidade, os elementos (Na^+ e Cl^-) apresentaram, como esperado, um incremento enquanto os elementos (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}) apresentaram declínio, e N e fósforo não apresentaram variações significativas (Tabela 5).

O Ca^{2+} é um cátion divalente constituinte da lamela média das paredes secundárias das células vegetais e é extremamente importante na manutenção da integridade da membrana e na regulação da absorção de nutrientes através das membranas das células (Sopandie *et al.*, 1995; Gobinathan *et al.*, 2009; Taiz e Zaiger, 2009). Entretanto, Lee e Liu (1999), comprovaram que o estresse osmótico causado pela alta salinidade (NaCl) afeta a absorção e translocação de Ca nos vegetais, como observado no conteúdo de Ca em *S. auriculata* submetidos ao incremento na concentração de NaCl (Tabela 5), descritos neste trabalho. Estes resultados corroboram também com os obtidos por Niaz e Rasul (1998). Estes autores realizaram um estudo com *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes*, as quais foram submetidas à estresse salino induzido por diversos sais, incluindo o NaCl, que também ocasionou um decréscimo no conteúdo de Ca nos tecidos destas plantas.

O potássio é o cátion mais abundante no citoplasma das células e já foi comprovado que a substituição de uma parte significativa de K^+ por Na^+ no citoplasma produz toxicidade (Haro *et al.*, 2010). De acordo com Niu *et al.* (1995), o cátion Na^+ age como um competidor com K^+ durante o processo de absorção,

sugerindo que o mecanismo de absorção desses dois cátions são similares. Essa competição entre Na^+ e K^+ pelo mesmo local de entrada no simplasto (citoplasma e membranas) resulta na deficiência de K^+ (Maathuis e Amtmann, 1999).

Os estresses ambientais, tais como a toxicidade do metal, salinidade e seca, afetam a absorção e o transporte de K^+ nas plantas (Shabala e Cuin, 2008; Chołuj et al., 2008; Xu et al., 2010). O conteúdo de K^+ em *S. auriculata* também diminuiu (Tabela 5) nas diferentes concentrações salinas quando comparados ao controle. Este decréscimo provavelmente ocorreu por consequência da relação antagônica que ocorre entre íons de mesma carga, e competitiva que existe entre Na^+ e K^+ (Niu et al. 1995; Niaz e Rasul., 1998). Por consequência, a razão Na^+/K^+ aumentou com o aumento da salinidade (Tabela 5). Este resultado é semelhante ao encontrado por Jampeetong e Brix (2009) no estudo realizado com *Salvinia natans* submetidas à salinidade com 0, 50, 100 e 150 mM de NaCl. A capacidade de manter a homeostase Na^+/K^+ nas células é crucial para a tolerância das plantas à salinidade (Japeetong e Brix, 2009). Alguns autores têm mostrado que o decréscimo da concentração K^+ no citosol concomitantemente ao aumento da razão Na^+/K^+ é característico da toxicidade induzida por Na (Maathuis e Amtmann, 1999).

No presente estudo, também foi verificado o decréscimo do conteúdo de Mg^{2+} (Tabela 5) em *S. auriculata*. De acordo com Esteves e Suzuki (2008) o excesso de Na reduz a absorção de Mg^{2+} pelas plantas. A redução do conteúdo de Mg^{2+} também foram encontrados nos tecidos de outras espécies, como *Eichornia crassipes* e *Pistia stratiotes* (Niaz e Rasul, 1998), *Hydrilla verticillata* (Rout e Shaw, 2001), *Typha domingensis* (Esteves e Suzuki, 2008) e *S. natans* (Japeetong e Brix, 2009), submetidas à diferentes concentrações de salinidade. O Mg^{2+} e N são constituintes das moléculas de clorofila (Taiz e Zeiger, 2009) e, portanto a alteração no conteúdo desses elementos pode afetar o teor de clorofila. O Mg^{2+} também atua em vários processos enzimáticos que envolvem a transferência de fosfato (Taiz e Zeiger, 2009).

O P participa de vários processos metabólicos nas plantas, como a transferência de energia, síntese de ácidos nucléicos, glicólise, respiração, ativação e desativação de enzimas, reações redox e no metabolismo de carboidratos (Araújo e Machado, 2006). A interação entre salinidade e a concentração de P em plantas é tão complexa quanto à relação entre salinidade e a concentração de N (Grattana e Grieveb, 1999). Essas interações são altamente dependentes das espécies de plantas, da idade de

desenvolvimento da planta, da composição e concentração da salinidade (Grattana e Grieveb, 1999). Alguns estudos relatam que a salinidade afeta o conteúdo de P nas plantas (Aslam, 1992) enquanto outros relatam que não houve alteração do conteúdo de P (Naheed *et al.*, 2008). No presente estudo os resultados (Tabela 5) evidenciaram uma pequena tendência ao decréscimo no conteúdo de P, mas não foram verificadas diferenças significativas no conteúdo de P em *S. auriculata* nas diferentes concentrações de NaCl, sugerindo que para esta espécie o estresse salino pode estar associado a um decréscimo deste elemento. Entretanto, ainda não está completamente elucidado o mecanismo pelo qual o NaCl influencia a absorção de P (Silva *et al.*, 2008).

O nitrogênio é absorvido pelas plantas principalmente sob formas inorgânicas como nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) e a assimilação ocorre apenas na forma de (NH_4^+) (Souza e Fernandes, 2006). O amônio deriva da redução do nitrato e de outras vias metabólicas como a fotorespiração e o catabolismo de aminoácidos e também pode ser absorvido pelas raízes (Teixeira e Fidalgo, 2009). Neste trabalho a avaliação do conteúdo de N revelou um pequeno aumento progressivo com o aumento das concentrações de NaCl (Tabela 5), mas não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos.

O teor de prolina em *S. auriculata* aumentou com a salinização (Figura 3). O acúmulo de prolina em plantas submetidas a estresse salino é bem documentado (Hare e Cress, 1997), pois a fim de manter a homeostase durante o estresse, as plantas precisam dispor de mecanismos especiais de adaptação a alteração da pressão osmótica dentro da célula (Summart *et al.*, 2010). No estudo com *Salvinia natans* sob estresse salino com 0, 50, 100 e 150 mM de NaCl também foi observado o aumento no teor de prolina (Japeetong e Brix, 2009).

No presente trabalho, verificou-se após duas horas de incubação com os diferentes tratamentos que o conteúdo de NO extracelular liberado pelas raízes de *S. auriculata* aumentou com a salinidade, sendo maior naquelas incubadas com 150 mM de NaCl (Figura 5). Estes resultados sugerem que a salinidade estimula a síntese de NO em raízes de *S. auriculata*, e que pode ocorrer uma maior liberação de NO para o meio extracelular em condições de estresse salino comparando-se ao conteúdo endógeno, que reduziu com o aumento das concentrações de NaCl (Figura 7a), sendo significativamente maior na concentração de 50 mM.

Estudos têm mostrado que o estresse salino pode induzir um aumento rápido nos níveis de NO nas plantas logo após a exposição aos tratamentos, uma vez que este composto está envolvido na tolerância das plantas ao sal (Zhao *et al.* 2004, 2007; Zhang *et al.* 2006). Neste sentido, o aumento da concentração de NO pode estar associado à síntese deste composto visando a proteção de *S. auriculata* contra o estresse salino a que foi submetida. Esta hipótese está baseada no fato que o NO é uma molécula de rápida difusão pela planta, não necessitando de receptor de membrana, e por ser um sinalizador de vida curta (~8s), o NO é considerado um mensageiro secundário associado a respostas rápidas de defesa na planta (Wendehenne *et al.*, 2001). Cada situação de estresse pode desencadear uma cascata de sinalização na célula resultando na indução de respostas de defesa específicas. O reconhecimento destes estímulos resulta na produção de moléculas sinalizadoras, as quais levam a mudanças na concentração ou modulação dos mensageiros secundários, e conseqüentemente, ativando a resposta de defesa (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007).

Neste sentido, pode-se sugerir que o aumento na concentração do NO endógeno no tratamento com 50 mM de NaCl após duas horas de incubação pode ter contribuído para o aumento no teor de Clorofila *a*, carotenóides, e da biomassa em *S. auriculata* neste tratamento após cinco dias de incubação, resultando conseqüentemente, neste melhor desempenho das plantas comparativamente àquelas submetidas aos demais tratamentos salinos. Alguns estudos relatam que a adição de um doador exógeno de NO, o nitroprusiato de sódio (SNP) protege o fotossistema II (Uchida *et al.*, 2002) e pode preservar os pigmentos fotossintéticos através do efeito direto sobre a biossíntese de clorofila (Beligni e Lamattina, 1999; Jasid *et al.*, 2009) . O conteúdo de NO endógeno mantido a níveis mais elevados nas plantas submetidas ao tratamento salino com 50 mM após duas horas de incubação também pode ter contribuído para que nesta concentração salina, o teor de clorofila *a* e carotenóides fossem mais elevados quando comparados aos demais tratamentos após 5 dias. Segundo Beligni e Lamattina (1999) a proteção da clorofila mediada pelo NO pode ser devido a capacidade do NO eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS), que são produzidas nas plantas em situações de estresse. Desta forma, pode-se sugerir que o aumento de NO endógeno após duas horas de incubação no tratamento com 50 mM de NaCl pode ter funcionado como um sinalizador, estimulando a preservação/biossíntese dos pigmentos fotossintéticos,

via redução de ROS, em plantas de *S. auriculata* após cinco dias neste tratamento, comparativamente às concentrações maiores, onde foi observado clorose das plantas após cinco dias de incubação. Estudos têm mostrado que o NO também está relacionado à expansão foliar (An *et al.*, 2005). Desta forma, o maior conteúdo endógeno de NO verificado no tratamento 50 mM após duas horas de incubação pode ter influenciado o aumento do PF e PS em *S. auriculata* após cinco dias de incubação.

Adicionalmente, verificou-se que nas maiores concentrações de NaCl (100 e 150 mM) houve uma maior liberação extracelular de NO (Figura 5) concomitantemente a um menor conteúdo intracelular de NO (Figuras 7) após duas horas de incubação, sugerindo que a produção e manutenção do NO dentro da célula é um fator importante para que ocorra a sinalização celular em *S. auriculata*, que permitiu assim o melhor desempenho e adaptação plantas na condição de 50 mM de NaCl. Estudos sobre a biossíntese, remoção e movimento de NO nas plantas têm sido conduzidos por vários pesquisadores (Neill *et al.*, 2008). Segundo Gladwin *et al.* (2005) é bem conhecido que as moléculas bioativas como o NO são rapidamente removidos ou metabolizados durante os eventos de sinalização. A natureza do NO de ser um radical livre significa que este composto poderá rapidamente reagir com outros radicais livres que podem estar presentes no conteúdo celular. Em animais e plantas, o NO é produzido e ao mesmo tempo ele pode reagir com espécies reativas de oxigênio (ROS) no mesmo local de síntese (Neill *et al.*, 2008). Assim, os menores níveis endógenos de NO nas maiores concentrações de NaCl pode estar associado com a liberação exógena e/ou com a reação do NO com outros componentes celulares, sendo então convertido a outros compostos que podem assim estimular a tolerância ao estresse salino ou causar danos. Dentre os compostos, o NO pode agir de forma citotóxica quando reage com o radical superóxido (O_2^-) formando o peroxinitrito (NOO^-) que é um mediador de dano e/ou morte celular por induzir a fragmentação de DNA e causar peroxidação lipídica da membrana plasmática (Delledone *et al.*, 2002).

O NO pode se difundir dentro da célula a partir de locais de produção, como a mitocôndria, para outras regiões da célula onde poderá induzir um efeito pela interação com proteínas alvo. Também é possível que o NO possa se difundir para fora da célula através da membrana plasmática para outras células adjacentes para estimular o seu efeito (Neill *et al.*, 2008). No presente trabalho verificou-se que

houve uma maior concentração de NO no meio extracelular (Figura 5a) comparado ao meio intracelular (Figura 7a) após duas horas de incubação. Estes resultados sugerem que pode ter ocorrido uma movimentação do NO do meio intracelular para o extracelular nos tratamentos com as maiores concentrações de NaCl (100 e 150 mM) após duas horas de incubação. Elevadas concentrações salinas danificam a estrutura da membrana plasmática das células através de alterações de constituintes fundamentais como Ca (Schapire *et al.*, 2008) que desempenha uma papel essencial nos processos que preservam a integridade estrutural e funcional das membranas, além de regular o transporte e seletividade de íons nas plantas (Shoresh *et al.*, 2011). Neste sentido, pode-se supor que as alterações na estrutura da membrana plasmática podem também ter contribuído para uma maior liberação de NO extracelular em plantas de *S. auriculata* após duas horas de incubação.

Estudos realizados com a adição de um doador exógeno de NO, o SNP, mostraram que o NO pode aumentar a tolerância em plantas pelo aumento na matéria seca, redução de danos oxidativos, e manutenção de alta relação de Na^+/K^+ no citoplasma (Zhang *et al.*, 2006, 2007, Shi *et al.*, 2007). Este gradiente pode ser controlado pela ativação de H^+ -ATPases induzidas pelo NO (Zhang *et al.*, 2006), que produzem um gradiente de H^+ através da membrana vacuolar, funcionando como uma força para a troca de Na^+/H^+ , a qual pode contribuir para a homeostase de Na^+ e K^+ em *Avicennia marina* (Chen *et al.*, 2010). Desta forma, estes autores sugerem que o NO funciona como um sinal na tolerância ao estresse salino nesta espécie pelo aumento na secreção Na^+ .

As raízes de *S. auriculata* submetidas à salinização durante um período de cinco dias apresentaram uma redução nos níveis de NO tanto endógeno (Figura 5a) quanto exógeno (Figura 7b). Estes resultados sugerem que após cinco dias de incubação, o conteúdo de NO existente pode não ser mais devido a uma sinalização induzida pelo estresse salino, e sim uma resposta morfológica e fisiológica da planta. Esta hipótese está baseada no fato de que, com o aumento da concentração salina, as plantas apresentam-se amareladas e de coloração bronze (Figura 1) que pode ser decorrente do aumento de carotenóides (Tabela 4) e redução de alguns nutrientes como Mg^{2+} (importante para a fotossíntese), K^+ e Ca^{2+} (Tabela 5), resultando na redução do PF (Figura 3a). Por outro lado, o aumento dos níveis de NO após duas horas de incubação pode estar relacionado com estímulos que resultam na sinalização para a tolerância ao estresse salino em *S. auriculata*. Neste

sentido, ressalta-se a importância das análises do conteúdo de NO em raízes de *S. auriculata* com duas horas incubação, visando identificar os efeitos do NaCl na sinalização do NO no início da indução do estresse, comparativamente ao final da incubação.

Os resultados do presente estudo mostram que as concentrações salinas de NaCl alteram a bioquímica e fisiologia de *S. auriculata* revelando que em determinada concentração (equivalente a 50 mM) as plantas induzem a produção de NO no início do processo (após duas horas) que provavelmente pode estar associado à sinalização para a produção de compostos que auxiliam na tolerância ao estresse após cinco dias de incubação, enquanto nas concentrações mais altas (150 mM), esta tolerância é reduzida. Desta forma, o presente estudo mostrou que *S. auriculata* pode se desenvolver muito bem em ambientes com salinidade moderada (50 mM) simulando os ambientes de águas oligohalinas, dominantes na paisagem costeira norte fluminense. Estes resultados são fundamentais para entender os mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados à adaptação destas espécies de macrófitas em condições salinas.

Capítulo 2

Efeitos do estresse salino induzido por NaCl e Na₂SO₄ sobre a fisiologia e morfologia de *Salvinia auriculata* Aubl.

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos dos sais NaCl e Na₂SO₄ no conteúdo de Ca²⁺, Cl⁻, K⁺, Mg²⁺, N, P, S, Na, teor de clorofila total, teor de prolina, e na morfologia das folhas de *Salvinia auriculata* Aubl. As plantas foram coletadas manualmente em uma lagoa do Norte do Estado do Rio de Janeiro, e após um período de aclimação foram realizados experimentos em casa de vegetação com as concentrações 0, 100, 200 mM dos sais NaCl e Na₂SO₄ separados e unidades experimentais. Após sete dias de experimento foram verificados nos tratamentos salinos a diminuição do conteúdo dos íons Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, P, N e do teor de pigmentos fotossintetizantes (clorofila total e carotenóides) em *Salvinia auriculata*. O teor de prolina mostrou uma tendência ao incremento quando comparado ao controle. Nos fragmentos das folhas de *Salvinia auriculata* observados sob microscópio óptico foram visualizadas mudanças na estrutura das células do parênquima paliçádico e na estrutura dos cloroplastos das plantas submetidas aos tratamentos salinos. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou uma desorganização das membranas internas e externas dos cloroplastos das células das plantas submetidas à salinidade, e maior presença de grãos de amido no interior dos cloroplastos. O microscópio eletrônico de varredura evidenciou a integridade dos tricomas e das células do limbo foliar de *Salvinia auriculata* submetidas ao tratamento controle e as mudanças na morfologia das células provocadas pela salinização. Para todos os efeitos da salinização avaliados, foi notado que o incremento na concentração do sal Na₂SO₄ resultou em maior dano a macrófita aquática flutuante *Salvinia auriculata*.

Palavras Chave: *Salvinia auriculata*, nutrientes, prolina, pigmentos, microscopia.

1. Introdução

O processo de salinização, que constitui o aumento dos cátions Na^+ , K^+ , e Mg^{2+} , e dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , HCO_3^- e CO_3^{2-} (Goodman *et al.*, 2010) em sistemas aquáticos continentais, pode ocorrer devido às trocas diretas de água com o ambiente marinho adjacente; à processos de abertura de barra de areia entre o mar e o ecossistema aquático; pelo spray marinho, que pode alcançar os corpos d'água como consequência de tempestades e ventos, e devido a períodos de seca em que a evaporação da água é maior que a precipitação. A salinização dos corpos d'água também pode ocorrer através da irrigação da produção agrícola que pode levar o sal acumulado nos solos irrigados para águas de rios e lagos a jusante (Rengasamy, 2006).

O incremento da salinidade nos sistemas aquáticos afeta a maioria das plantas, causando não apenas estresses iônicos e osmóticos (Owens, 2001), como várias alterações bioquímicas e morfológicas (Muhammed *et al.*, 1987; Jampeetong and Brix, 2009;). Com o aumento da salinidade a riqueza de espécies (Kipriyanova *et al.*, 2007) e abundância de plantas aquática também são afetadas (Brock *et al.*, 2005).

A toxicidade nas plantas resulta principalmente de altas concentrações dos íons Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} (Chinnusamy e Zhu, 2003), embora a maioria dos estudos sobre o efeito da salinidade nas plantas estão associados ao excesso de NaCl e poucos estudos têm focado a atuação de Na_2SO_4 no crescimento (Renault *et al.*, 2001; Stoeva e Kaymakanova, 2008) e na fisiologia das plantas (Pagter *et al.*, 2009). As espécies vegetais variam quanto a intensidade da toxicidade gerada pelos sais NaCl e Na_2SO_4 , e algumas são mais afetadas pelo NaCl e outras por Na_2SO_4 (Rogers *et al.*, 1998; Renault *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2006; Pagter *et al.*, 2009).

O presente estudo avaliou os efeitos de diferentes concentrações dos NaCl e Na_2SO_4 na morfologia e fisiologia da macrófita aquática flutuante *S. auriculata* com objetivo de aumentar a nossa compreensão sobre a distribuição desta espécie em relação a ambientes aquáticos salobros na natureza.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem e análises químicas

Para realização deste estudo foram coletados indivíduos de *S. auriculata* na lagoa do Jacú localizada no Parque Cidade Luz no Município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. No laboratório de Ciências Ambientais as plantas foram lavadas em água corrente para retirada de material orgânico ou inorgânico aderido. As plantas foram armazenadas em caixas plásticas com solução de cultivo Hoagland modificada (Hoagland and Arnon, 1950). Após o período de aclimação foi realizado o experimento na casa de vegetação com os tratamentos 0, 100 e 200 mM dos sais NaCl e Na₂SO₄ (Merck) adicionados separadamente em 8 litros de solução de cultivo em diferentes unidades experimentais. Após sete dias de experimento foram coletadas amostras frescas de *S. auriculata* para o estudo de microscopia, pigmentos fotossintéticos e prolina. O restante das amostras foi acondicionada em sacos de papel e colocados em estufa de circulação de ar à temperatura de 60°C, durante 4 dias. Após esse período de secagem, as amostras foram trituradas em moinho de facas e alíquotas foram separadas para a determinação de Ca²⁺, Cl⁻, K⁺, Mg²⁺, Na⁺, S, N e P.

Os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) foram extraídos com solvente orgânico dimetilsulfóxido (Merck), e as amostras foram analisadas segundo a metodologia descrita em Wellburn (1994). O teor de prolina foi obtido de acordo com o método de Bates *et al.* (1993). A determinação dos nutrientes Ca²⁺, Cl⁻, e Mg²⁺, K⁺, Na⁺, P e S foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (AAS-ZEISS) de acordo com o método descrito por Malavolta *et al.* (1997). A determinação de N foi realizada pelo método Nessler (Jackson, 1965).

2.2. Solução Nutritiva

Para o preparo da solução de micronutrientes os reagentes foram acondicionados em um balão volumétrico de 1L que foi completo com água Milli-Q (Tabela 1). A solução de cada macronutriente foi preparada e adicionada às unidades experimentais separadamente de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Reagentes utilizados no preparo da solução de micro e macronutrientes de acordo com Hoagland and Arnon (1950) modificada.

Solução Estoque	Reagentes	Concentração solução estoque (g/L)	Volume da solução estoque (L)	Volume na solução Final (mL/L)
Micronutriente	KCl	1,864	1	2
	H ₃ BO ₃	0,773	1	2
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,169	1	2
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,062	1	2
	H ₂ MoO ₄	0,04	1	2
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,75	1	2
Macronutrientes	KNO ₃ ⁻	101,1	1	6
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,16	1	4
	NH ₄ NO ₃	80	1	2
	KH ₂ PO ₄	136	1	2
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	123,24	1	2
Fe + EDTA	EDTA	11,91	1	1
	FeCl ₃	5,19		

*A solução de Fe+EDTA foi preparada de acordo com o capítulo1.

2.3. Microscopia

Para observação das amostras de *S. auriculata* no microscópio óptico, microscópio eletrônico de transmissão e microscópio eletrônico de varredura, após o experimento foram feitos cortes de fragmentos do terço médio da lâmina foliar que foram fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5%, formoldeído 4% e tampão cacodilato 0,05M em pH 7,2 por um tempo de duas horas. Os fragmentos das folhas de *S.auriculata* foram lavados com tampão cacodilato 0,05 M por três vezes.

Em seguida, os fragmentos foram pós fixados em solução aquosa contendo tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão cacodilato 0,05M, pH~7,2, temperatura ambiente, durante 1 hora na ausência de luz. Após nova lavagem (3 vezes – 1 hora cada vez) em tampão cacodilato 0,05M os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de acetona (50%,70%,90% e 3 vezes 100%) com tempo de uma hora para cada concentração (Bozzola and Russel, 1992). Para a microscopia óptica, os fragmentos foram infiltrados com resina epóxi (Epon Polibed). A polimerização da resina foi realizada a 60°C. Cortes semifinos, aproximadamente 1 µm de espessura, foram obtidos com navalhas de vidro em ultramicrotomo

(REICHERT ULTRACUT-S). A coloração foi realizada com solução aquosa de azul de toluidina 1%. Lâminas permanentes foram montadas com Entellan. A documentação foi realizada em microscópio óptico Axioplan ZEISS (Oberkochen, Germany), utilizando-se câmara digitalizadora Hamamatsu C3077 e software Analysis - LINK/ISIS/ZEISS (Oxford, UK).

Para preparo dos fragmentos para posterior observação no microscópio eletrônico de transmissão, após a infiltração e inclusão do material como descrito anteriormente, foram retirados cortes ultrafinos (70 – 90nm) em ultramicrotomo Reichert, com auxílio de faca de diamante. Os cortes foram coletados em grades de cobre de 300 mesh. A contrastação de rotina foi realizada com acetato de uranila 5,0 % por 20 min e solução de citrato de chumbo por 5 min em temperatura ambiente. O material foi observado e fotografado com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão ZEISS – TEM 900, a uma aceleração de voltagem de 80 KV.

O preparo das amostras para a microscopia eletrônica de varredura consistiu dos mesmos procedimentos descritos para microscopia óptica, até a desidratação. Após a desidratação, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico de CO₂ utilizando o aparelho CPD-030 BAL-TEC (Lienchtenstein). Os fragmentos das folhas foram aderidos com fita adesiva de carbono dupla-face (3M) e cola de carbono em suportes adequados. As amostras foram cobertas por “sputtering” com uma camada aproximadamente 20 nm de ouro (SCD-050 BAL-TEC-Liechtenstein). A observação e documentação digital (512X480 TIFF) foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 962 – ZEISS), a uma aceleração de voltagem de 25 kV.

2.4. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se análise de variância Two Way com o teste a *posteriori* de Bonferroni, adotando o nível de significância de 0,05.

3. Resultados

Os tratamentos salinos afetaram o conteúdo de nutrientes em *S. auriculata* (Tabela 2). O conteúdo de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , N e P diminuíram em *S. auriculata* nos diferentes tratamentos salinos (100 mM de NaCl, 200 mM de NaCl, 100 mM de Na_2SO_4 e 200 mM de Na_2SO_4). Entretanto a redução do conteúdo nutricional ocorreu principalmente nas plantas submetidas aos tratamentos salinos com 200 mM de Na_2SO_4 . Os resultados do conteúdo de Ca^+ , K^+ , Mg^{2+} , N e P das plantas submetidas ao tratamento controle (0) e das plantas submetidas ao tratamento com 200 mM de Na_2SO_4 diferiram significativamente ($p < 0,05$).

O conteúdo de Cl^- foi maior nas plantas submetidas aos tratamentos com 100 e 200 mM de NaCl quando comparadas as plantas submetidas ao tratamento controle e aos tratamentos com 100 e 200 mM de Na_2SO_4 e as diferenças significativas ocorreram entre os tratamentos com 100 e 200 mM de NaCl e os demais tratamentos (0, 100 e 200 mM de Na_2SO_4).

O conteúdo de S foi maior nas plantas submetidas aos tratamentos com 100 e 200 mM de Na_2SO_4 e as diferenças significativas ocorreram entre os tratamentos com 100 e 200 mM de Na_2SO_4 e os tratamentos controle, 100 e 200 mM de NaCl. A razão Na^+/K^+ mostrou uma tendência ao aumento nos tratamentos salinos quando comparados ao controle, entretanto a razão Na^+/K^+ foi maior nas plantas submetidas ao tratamento com 200 mM de Na_2SO_4 e ocorreu diferença significativa entre as plantas submetidas ao tratamento controle e as plantas submetidas ao tratamento com 200 mM de Na_2SO_4 . O conteúdo de N diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre as plantas submetidas ao tratamento controle e as plantas submetidas ao tratamento com 200 mM de Na_2SO_4 . Entretanto, também foi observado que nas plantas submetidas aos tratamentos com 100 e 200 mM de NaCl e no tratamento com 100 mM de Na_2SO_4 houve uma tendência a redução do conteúdo de N em *S. auriculata*.

O conteúdo de P mostrou uma tendência a redução em todos tratamentos salinos quando comparados às plantas submetidas ao tratamento controle, mas a diferença significativamente ($p < 0,05$) ocorreu entre as plantas submetidas ao tratamento controle e ao tratamento com 200 mM de Na_2SO_4 .

Tabela 2: Concentração de nutrientes ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) em *S. auriculata* submetidas ao estresse salino induzido por NaCl e Na_2SO_4 . Entre parênteses estão os valores mínimo e máximo. As letras referem-se à estatística entre os tratamentos controle e salinos com NaCl e Na_2SO_4 .

	NaCl [mM]			Na_2SO_4 [mM]	
	0	100	200	100	200
Ca^{2+}	6,62a (6,53-6,81)	4,19ab (6,53-6,81)	3,79ab (3,78-3,86)	3,30ab (3,21-3,39)	2,73b (2,71-2,79)
K^+	39,93a (39,86-40,10)	23,22ab (23,21-23,40)	18,58ab (18,49-18,78)	18,38ab (18,02-18,93)	9,92b (9,87-10,16)
Na^+/K^+	0,06b (0,06-0,06)	1,17ab (1,17-1,18)	2,59ab (2,58-2,61)	2,37ab (2,23-2,42)	7,50a (7,47-7,71)
Na^+	2,33b (2,23-2,33)	27,15a (27,15-27,51)	48,24a (48,03-48,60)	43,52a (42,16-43,63)	75,85a (74,38-76,14)
Mg^{2+}	3,35a (3,23-3,36)	3,18ab (3,18-3,23)	3,07ab (3,06-3,08)	2,33ab (2,33-2,34)	1,30b (1,28-1,32)
N	14,61a (14,61-14,75)	8,04ab (6,14-9,99)	4,98ab (4,83-4,98)	5,50ab (5,41-5,56)	3,85b (3,75-3,95)
P	35,72a (35,23-37,35)	25,47ab (25,29-26,65)	19,48ab (18,82-19,66)	24,32ab (21,84-24,71)	18,26b (17,47-18,99)
Cl^-	10,81b (10,65-11,77)	37,84a (37,52-38,48)	65,99a (65,03-65,99)	7,47b (7,16-8,11)	6,68b (6,36-7,79)
S	7,72b (7,64-7,85)	5,7b (5,73-5,94)	5,52b (5,51-5,60)	73,19a (71,60-73,57)	101,87a (101,62-103,46)

O teor de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total (clorofila *a* + *b*) e carotenóides em *S. auriculata* diminuiu com nas plantas submetidas aos tratamentos salinos (100 e 200 mM de NaCl e 100 e 200 mM de Na₂SO₄) quando comparados as plantas submetidas ao tratamento controle, e a diferença significativa ($p < 0.05$) foi notada entre *S. auriculata* submetida ao tratamento controle e os tratamentos com 200 mM de Na₂SO₄ (Tabela 3). A razão Clorofila *a*/Clorofila *b* (Cloa/Clob) apresentou uma tendência ao aumento nos tratamentos salinos embora não tenham ocorrido diferenças significativas.

Tabela 3: Mudanças no teor de clorofila *a* e *b*, razão clorofila *a*/clorofila *b* (Clo *a* / Clo *b*) clorofila total (Clo *a* + Clo *b*) e carotenóides (mg.g⁻¹ PS) na macrófita aquática *S. auriculata* submetida ao estresse salino induzido pelos sais NaCl e Na₂SO₄. Entre parênteses estão os valores mínimo e máximo. As letras referem-se à estatística entre os tratamentos controle e salinos com NaCl e Na₂SO₄.

Sal	[mM]	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Cloa/Clob	Clorofila total	Carotenóides
NaCl	0	58,81 _a (46,35 - 63,74)	21,10 _a (17,13 - 22,99)	2,77 _a (2,71 - 2,79)	79,92 _a (63 - 86,72)	10,65 _a (7,78 - 11,00)
	100	18,26 _{ab} (17,73 - 22,39)	7,06 _{ab} (6,83 - 9,65)	2,51 _a (2,32 - 2,68)	25,09 _{ab} (24,79 - 35,04)	4,12 _{ab} (2,88 - 4,96)
	200	14,11 _{ab} (12,97 - 16,9)	4,85 _{ab} (4,35 - 5,9)	2,91 _a (2,86 - 2,98)	18,96 _{ab} (17,32 - 22,80)	4,03 _{ab} (3,31 - 4,79)
Na ₂ SO ₄	100	15,51 _{ab} (14,53 - 16,55)	5,32 _{ab} (5,17 - 5,77)	2,87 _a (2,81 - 2,91)	20,83 _{ab} (19,70 - 22,33)	3,16 _{ab} (1,98 - 3,75)
	200	9,68 _b (9,38 - 11,51)	3,48 _b (3,03 - 3,96)	2,91 _a (2,70 - 3,19)	12,86 _b (12,71 - 15,46)	3,36 _b (2,79 - 3,54)

O teor de prolina (Tabela 4) apresentou uma tendência ao aumento em *S. auriculata* submetida aos tratamentos salinos, principalmente no tratamento com 200 mM de NaCl e Na₂SO₄. Entretanto, o teste estatístico não indicou diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 4: Mudanças no teor de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) nos diferentes tratamentos salinos. As letras referem-se à estatística entre os tratamentos controle e salinos com NaCl e Na₂SO₄.

Sal [mM]	Prolina(mg g ⁻¹ PS)
0	0.15a (0.12-0.22)
100 NaCl	0.42a (0.347-0.472)
200 NaCl	0.67a (0.42-0.79)
100 Na ₂ SO ₄	0.67a (0.62-0.86)
200 Na ₂ SO ₄	1.46a (1.09-1.72)

As imagens de microscopia óptica (Figura 1) evidenciam a integridade das células epidérmicas adaxiais e dos cloroplastos nas plantas submetidas ao tratamento controle (Figura 1A e 1B). Nos tratamentos salinos foram visualizadas mudanças na estrutura das células da epiderme em face adaxial que tomaram a forma abaloada. Os cloroplastos e as células epidérmicas em face adaxiais de *S. auriculata* apresentaram maiores alterações nos tratamentos com 200 mM de NaCl (Figura. 1D) e 200mM de Na₂SO₄ (Figura. 1F). Ainda na Figura 1F foi evidenciado o rompimento de uma célula da epiderme em face adaxial. No tratamento com 100

mM de Na_2SO_4 (Figura. 1E) foi notada maior desorganização dos cloroplastos quando comparado aos demais tratamentos.

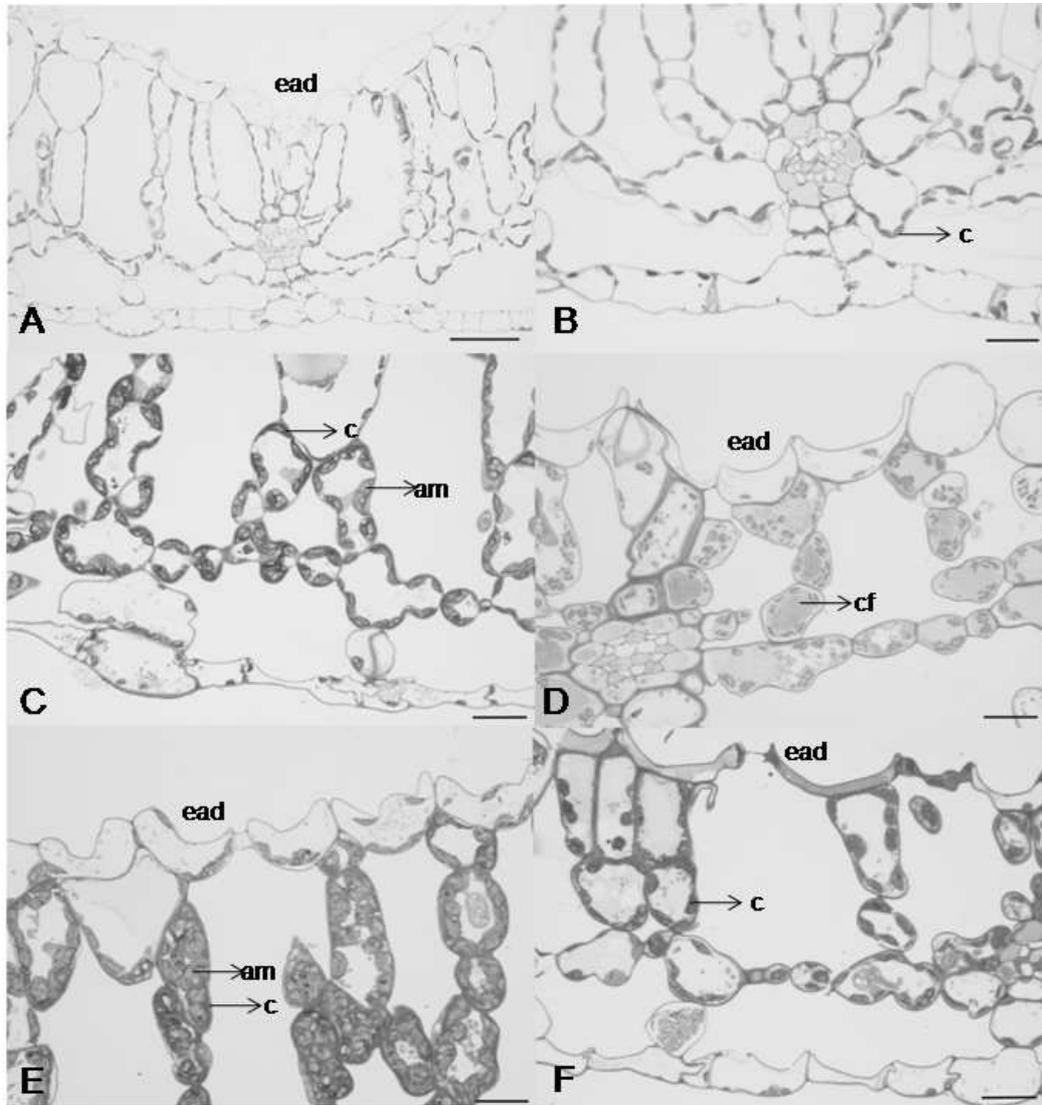


Figura 1: Microscopia óptica da secção transversal do limbo foliar de *Salvinia auriculata* evidenciando epiderme adaxial (ead), cloroplasto (c), grãos de amido (am), compostos fenólicos (cf). Barra A = 50 μm ; Barra B, C, D, E, F = 20 μm . Controle – A e B, 100 mM NaCl - C , 200 mM NaCl - D , 100 mM Na_2SO_4 - E , 200 mM Na_2SO_4 - F.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram um cloroplasto denso e a integridade das membranas da mitocôndria (Figura 2A). Em todos os tratamentos salinos foi observada presença de grãos de amido que aumentaram em tamanho e quantidade, especialmente no tratamento salino com 200 mM de NaCl (Figura 2C).

Nas células das plantas sob tratamento salino com 100 mM de NaCl (Figura 2B) a presença de plastoglóbulos, provavelmente corpúsculos de lipídeos. Nas células das plantas submetidas ao tratamento com 200 mM de NaCl foi visualizada a degradação do estroma e das lamelas do estroma e diminuição da quantidade de grana. A ausência de grana foi visualizada nas células de *S. auriculata* sob o tratamento com 100 mM do sal Na_2SO_4 (Figura 2D). A degradação das membranas do cloroplasto foi observada nas células das plantas submetidas ao tratamento com 100 mM de Na_2SO_4 (Figuras 2D) e a degradação da célula foi observada nas plantas submetidas ao tratamento com 200mM de Na_2SO_4 (Figura 2E).

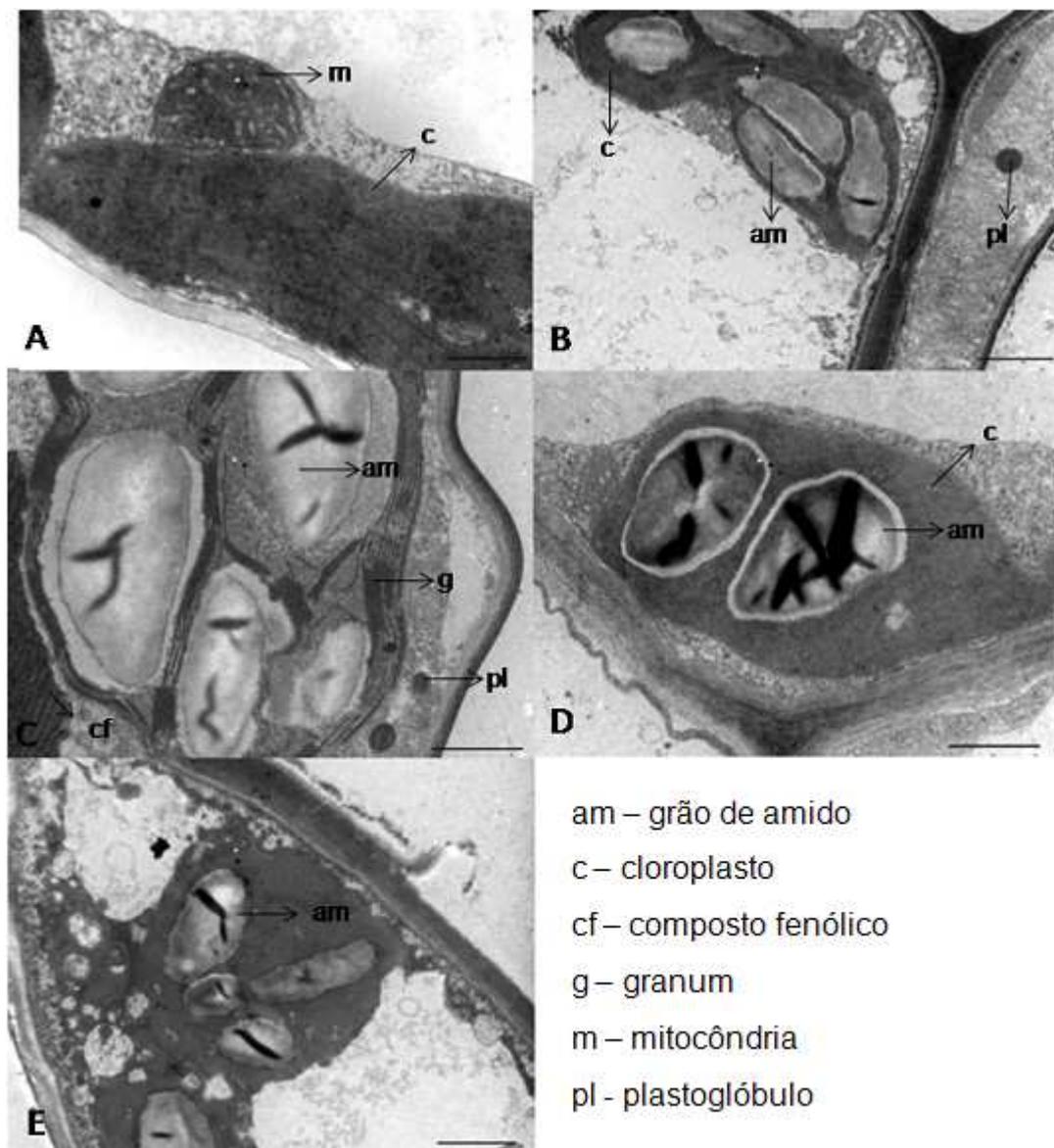


Figura 2: Microscopia eletrônica da transmissão do limbo foliar de *Salvinia auriculata* evidenciando mitocôndria, cloroplasto, grãos de amido, plastoglóbulos e granum. Barra A = 500nm; Barra B, E = 2 µm; Barra C, D = 1 µm. Controle - A, 100 mM NaCl - B, 200 mM NaCl - C, 100 mM Na_2SO_4 - D, 200 mM Na_2SO_4 - E.

Através da microscopia eletrônica de varredura foi observada a forma íntegra dos tricomas (Figura 3A e B) do limbo foliar de *S. auriculata* submetida ao tratamento controle. Nos tratamentos salinos (Figura 3 C,D,E,F) foi observada a progressiva perda da turgidez dos tricomas com aumento da salinidade. Os tricomas de *S.auriculata* foram mais danificados no tratamento salino com 200 mM do sal Na_2SO_4 .

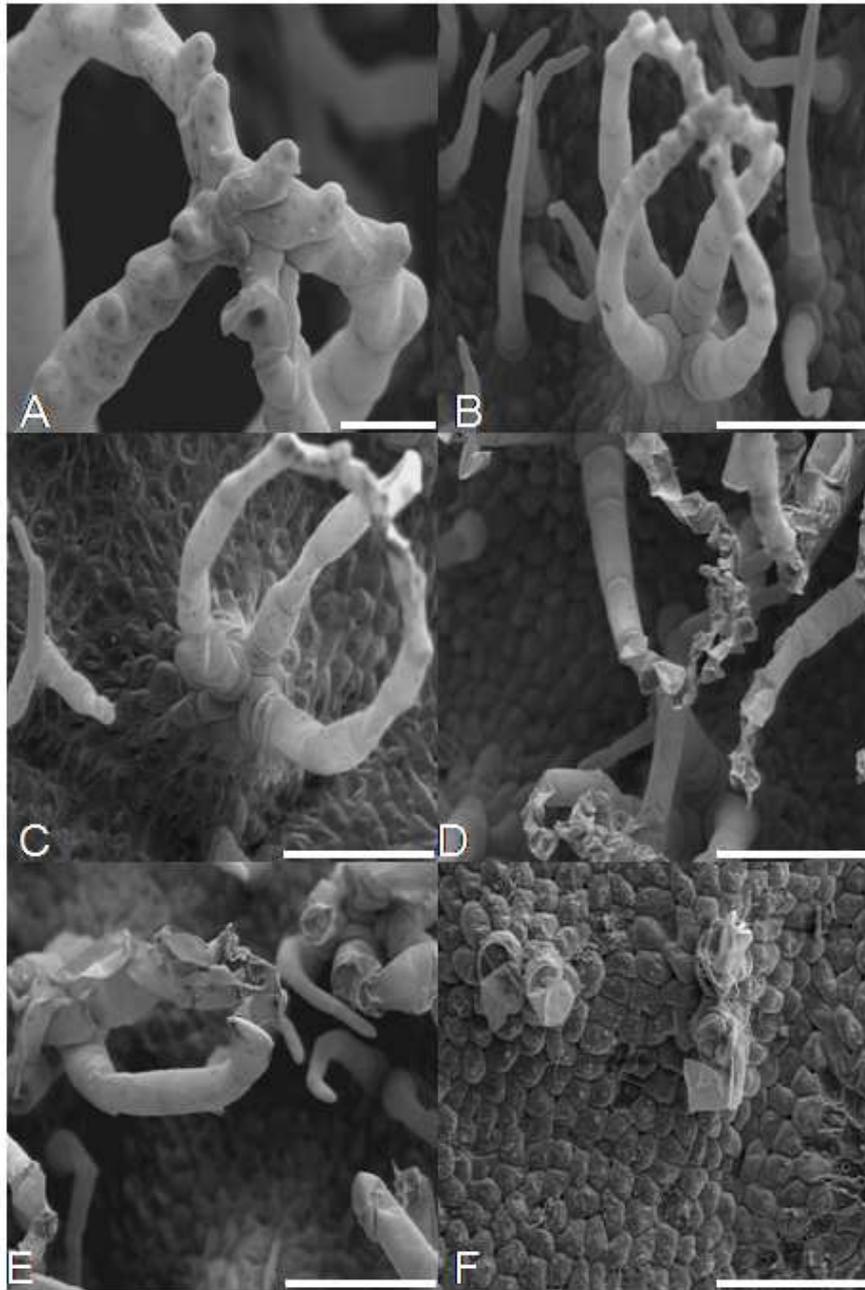


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura da face adaxial do limbo foliar de *Salvinia auriculata*:(A) planta controle; (B) planta controle; (C) planta com 100 mM de NaCl ; (D) planta com 200 mM de NaCl; (E) planta com 100 mM de Na_2SO_4 ; (F) planta com 200 mM de Na_2SO_4 . Barra A = 500 μm ; Barra B, C, D, E, F = 200 μm .

Na Figura 4 a microscopia de varredura ressalta a integridade dos tricomas (Figura 4A) e das células (Figura 4B) do limbo foliar de *S. auriculata* submetida ao tratamento controle. As células do limbo foliar submetido ao tratamento controle (Figura 4 B) apresentam superfícies mais uniformes quando comparadas as células do limbo foliar das plantas submetidas aos tratamentos salinos (Figura 4 C, D, E, F). A perda de turgidez das células foi observada no tratamento com 200 mM de Na_2SO_4 que causou alterações mais intensas na estrutura externa das células do limbo foliar de *S. auriculata* (Figura 4 E e F).

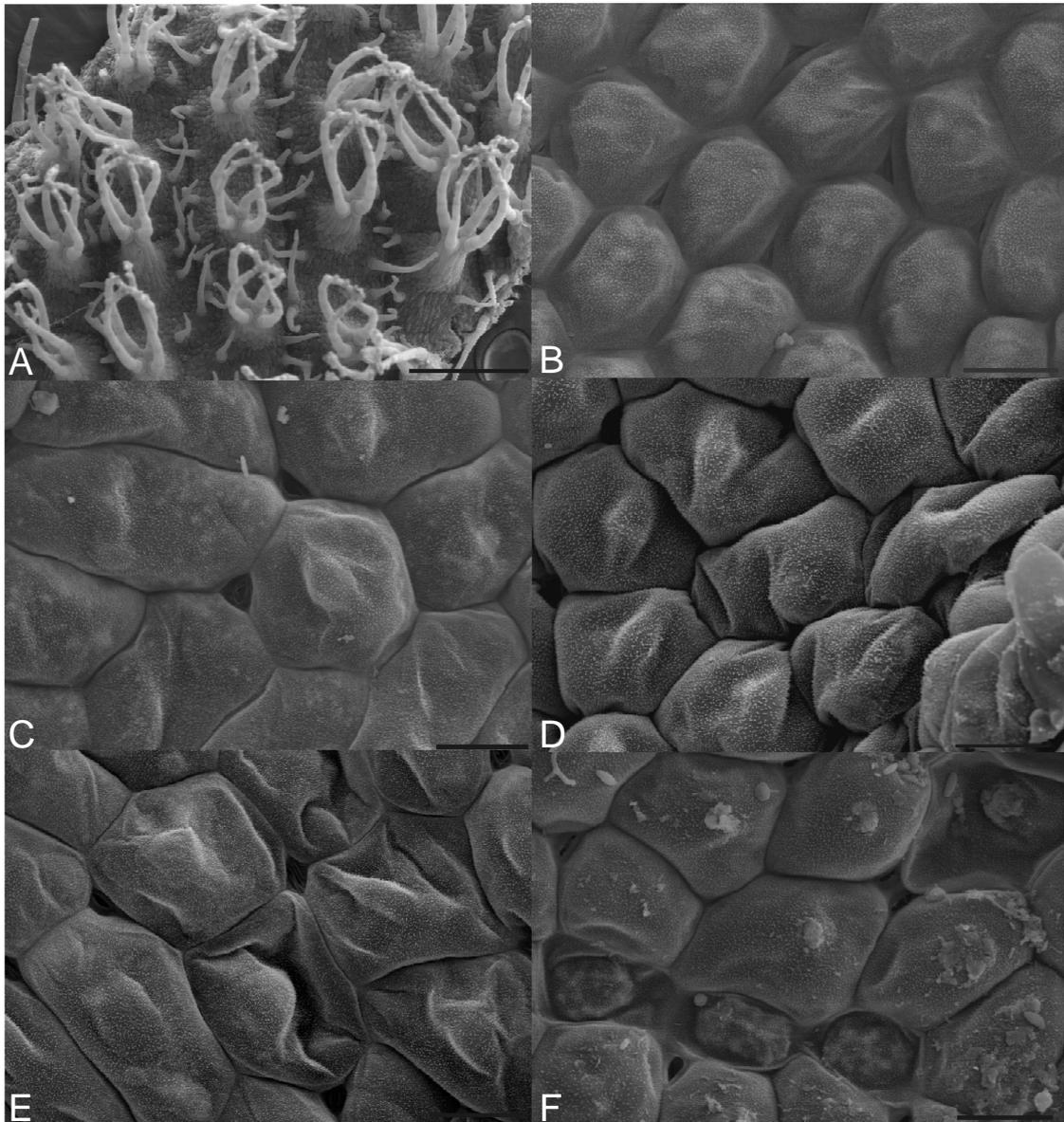


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura da face adaxial do limbo foliar de *Salvinia auriculata*:(A) plant control; (B) plant control;; (C) planta com 100 mM de NaCl ; (D) planta com 200 mM de NaCl; (E) planta com 100 mM de Na_2SO_4 ; (F) planta com 200 mM de Na_2SO_4 . Barra A = 500 μm ; Barra B, C, D, E, F = 20 μm .

4. Discussão

O estresse salino perturba a homeostase de água e de íons nas plantas resultando em excesso de Na^+ tóxico no citosol e a deficiência de íons essenciais (Hansegawa *et al.*, 2000). No presente estudo, a concentração dos nutrientes em *S. auriculata* diminuiu em todos os tratamentos salinos, principalmente no tratamento com 200 mM de Na_2SO_4 (Tabela 2). De acordo com Esteves (2009), o excesso de Na e S afeta não somente o equilíbrio osmótico, mas também o desenvolvimento foliar das plantas.

O Ca^{2+} funciona como um importante mensageiro secundário e molécula sinalizadora além de desempenhar um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas em condições normais, bem como em condições de estresse (Mahajan *et al.*, 2008). Entretanto, Rout e Shaw (2001), avaliando as conseqüências da salinização induzida por NaCl sobre o nível de Ca^+ e Mg^{2+} , encontraram resultados que demonstram a diminuição intracelular desses íons em *Hydrilla verticillata*, *Najas gramenia* e *Najas indica*. Os resultados apresentados neste estudo também mostram esta diminuição de Ca^{2+} e Mg^{2+} em *S. auriculata*. Entretanto, os organismos sob tratamentos com Na_2SO_4 foram mais afetados, corroborando o que foi observado por Renault *et al.* (2001), que estudaram os efeitos da salinidade induzida por NaCl e Na_2SO_4 sobre a concentração de íons Mg^{2+} em *Cornus stolonifera*. Esse fato pode ter ocorrido porque os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} quando conjugados ao SO_4^{2-} precipitam e também porque o excesso de Na^+ e SO_4^{2-} reduz a absorção de Mg^{2+} (Esteves, 2009). Hu e Schmidhalter (2005) também ressaltam que assim como acontece com K^+ o decréscimo na absorção de Ca^{2+} e Mg^{2+} nos tecidos vegetais sob condições de salinidade pode ser devido à interferência do Na^+ ou eventualmente formação de pares de íons e posterior precipitação. Outros estudos com plantas submetidas à salinização também mostram a redução da concentração de magnésio (Niaz e Rasul, 1998; Rout e Sahaw; 2001; Esteves e Suzuki, 2008; Japeetong e Brix, 2009) que faz parte da estrutura central da molécula de clorofila a e participa de vários processos enzimáticos que envolvem a transferência de fosfato.

O equilíbrio iônico, especialmente o equilíbrio de Na^+/K^+ , é fundamental para a tolerância das plantas à salinidade (Apse e Blumwald, 2007; Chen *et al.*, 2007). A baixa concentração do Na^+ no citosol e uma alta razão K^+/Na^+ auxilia na manutenção

do equilíbrio osmótico e bioquímico nas células vegetais (Yao *et al.*, 2010) . Neste sentido, a capacidade das plantas para combater o estresse salino também depende muito da quantidade de K^+ (Maathuis e Amtmann, 1999). Ao contrário do K^+ , o Na^+ é essencial apenas para as espécies C_4 , onde atua na translocação do piruvato em todo o envelope do cloroplasto, onde ele funciona como um micronutriente (Maathuis e Amtmann, 1999).

O potássio é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Taiz e Zeiger, 2009) e tem várias funções como a ativação de reações enzimáticas essenciais, como as reações que ocorrem na formação do piruvato; contribui para pressão osmótica no vacúolo e, por conseguinte a turgescência celular, que proporciona as células não lignificadas uma rigidez estrutural (Maathuis e Amtmann, 1999). Adicionalmente, a deficiência de K^+ reduz a atividade fotossintética, o teor de clorofila e a fixação de carbono (Zhao *et al.*, 2001).

Neste estudo o conteúdo de K^+ em *S. auriculata* diminuiu com o aumento da salinidade e a razão Na^+/K^+ aumentou. O aumento da razão Na^+/K^+ também foi observado no estudo com *S.natans* submetida à salinidade com tratamentos com 50, 100 e 150 mM do sal NaCl, no qual Jampeentong e Brix (2009) relatam que *S. natans* carecem de mecanismos para manter homeostase celular, e em alta concentração de Na^+ na solução causou a deficiência de K^+ .

Na literatura científica há controvérsia sobre o efeito da salinidade sobre a absorção de P (Navarro *et al.*, 2000). Em regiões salinas o P é facilmente disponível para as plantas, sendo o nitrogênio principal limitador (Esteves e Suzuki, 2008). Entretanto, a absorção de P foi inibida em *Cornus stolonifera Michx* tanto nos tratamentos com NaCl quanto nos tratamentos com Na_2SO_4 (Renault *et al.*, 2001). Os conteúdos de P e N em *S. auriculata* diminuíram com os tratamentos salinos. Isto provavelmente ocorreu porque a presença de Cl^- assim como SO_4^- reduzem a absorção de P por plantas de trigo e girassol (Sen and Bal, 2009). Possivelmente o mesmo deve ter ocorrido em *S. auriculata* justificando os nossos resultados que mostram um decréscimo na concentração de P tanto nas plantas submetidas aos tratamentos com NaCl quanto nas plantas submetidas ao Na_2SO_4 .

Segundo Ashraf e Sultana (2000) a salinização interfere na absorção e nas diferentes etapas do metabolismo de N. A salinidade é considerada uma das principais responsáveis pela baixa disponibilidade de N no ambiente (Debouba *et al.*, 2006), pois inibe a fixação biológica de N através da redução da nodulação (Elsheikh

e Wood 1990, *apud* Esteves e Suzuki, 2008). O estudo sobre o efeito da salinidade na macrófita *Triglochin procerum* revelou uma diminuição na porcentagem de N (Roache et al., 2006). Resultado semelhante também foi encontrado no estudo com *Eichhornia crassipes* submetidas à salinidade (Casabianca e Laugier, 1995). Desta forma, o incremento na salinidade resulta em diminuição na qualidade nutricional das plantas, em função da diminuição no teor de N.

O S é constituinte de aminoácidos (cisteína e metionina), de coenzimas e vitaminas essenciais ao metabolismo das plantas (Taiz e Zeiger, 2009), pois o desequilíbrio entre a oferta e a demanda de S nas plantas limita o crescimento das mesmas (Hawkesford, 2007). Como um resultado esperado o S foi maior em *S. auriculata* submetidas aos tratamentos salinos com Na_2SO_4 . O SO_4^{2-} é a principal forma de S absorvida pelas plantas (Salisbury e Ross, 1992). Entretanto para se tornar parte de moléculas orgânicas como aminoácidos e proteínas ou ser armazenado no vacúolo o SO_4^{2-} é reduzido a sulfitos e sulfetos por ações enzimáticas (Nikiforova et al., 2006; Balieiro et al., 2007). Parte do SO_4^{2-} em excesso é armazenada no vacúolo e o restante através de ações enzimáticas é reduzido a sulfito e posteriormente a sulfetos que após reagir com a enzima O-acetilserina formarão o aminoácido cisteína (Nikiforova et al., 2006; Vitti et al., 2006) a partir do qual será formado o aminoácido metionina (Taiz e Zeiger, 2009). Como o teor de S não incrementou nas plantas sob tratamento com NaCl pode-se supor que a oferta de sulfato neste tratamento supria a demanda de desenvolvimento de *S. auriculata*.

O teor de clorofila *a* e *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenóides diminuíram com os tratamentos salinos (Tabela 3). Khan (2003; 2004) constatou que o estresse salino torna mais lenta a produção de pigmentos fotossintéticos. Sharma e Hall (1991) ressaltaram que o estresse salino induz a degradação de β -caroteno causando o decréscimo no teor de carotenóides que são constituintes integrais das membranas dos tilacóides e atuam na absorção e na transferência de luz para clorofila além de protegerem a clorofila da fotooxidação (Taiz e Zeiger, 2009; Lima et al., 2004). Desta forma, a degradação na síntese de carotenóides pode implicar na degradação de clorofilas (Lima et al., 2004). No presente estudo foi evidenciada nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão a degradação dos cloroplastos, local onde ocorre a fotossíntese (Figura 2). Esta degradação do aparato fotossintético refletiu na redução do teor dos pigmentos fotossintéticos. Em estudos realizados com *Salvinia molesta* submetidas a 50, 100 e 200 mM de NaCl (Upadhyay e Panda,

2005) e *Salvinia natans* (Jampeetong e Brix, 2009), submetidas a concentração de 50, 100, 200 mM de NaCl, também foram observadas a diminuição no teor de carotenóides e clorofila. Provavelmente, por esse fato a potencialidade de *S. auriculata* colonizar ambientes salinos também é reduzida.

O acúmulo de prolina ocorre nas plantas após algum estresse ambiental (Ashraf, 1994; Ali *et al.*, 1999) como uma resposta adaptativa de tolerância ao estresse (Verbruggen e Hermans, 2008). O acúmulo de prolina pode influenciar na tolerância ao estresse de várias formas como, por exemplo, protegendo a integridade das proteínas, aprimorando as atividades de muitas enzimas e diminuindo os níveis de espécies reativas de oxigênio (Szabados e Saviouré, 2009). Estas características de atuação da prolina, dentre outras, com a finalidade de manter a homeostase celular durante condições de estresse é ainda mal compreendida (Szabados e Saviouré, 2009), mas geralmente, sob condições de privação de água ou salinidade extrema, o acúmulo de prolina atua na defesa contra o estresse osmótico. No presente estudo foi notada uma tendência ao aumento do conteúdo de prolina com os tratamentos salinos, especialmente no tratamento com 200 mM de Na₂SO₄ (Tabela 4). No estudo realizado por Pagter *et al.* (2009) com *Phragmites australis* submetida à soluções de cultivo com NaCl e Na₂SO₄ separadamente também foi constatado o maior acúmulo de prolina nas folhas quando comparado ao tratamento controle, entretanto o maior acúmulo de prolina ocorreu nas folhas das plantas submetidas ao tratamento com NaCl.

As imagens de microscopia óptica mostraram que a salinidade danifica as células da epiderme adaxial do limbo foliar de *S. auriculata* que assumiram formas abauladas nos tratamentos salinos (Figura 1). Também foi visualizado o rompimento das células da epiderme adaxial nas plantas submetidas ao tratamento salino com 200 mM do sal Na₂SO₄. Este fato deve ter ocorrido provavelmente como consequência da perda de água pelas células ocasionada pela salinização e diferença osmótica. A presença de compostos fenólicos no interior das células do parênquima paliçádico das folhas de *S. auriculata* submetidas aos tratamentos salinos possivelmente está relacionada ao fato de que os compostos fenólicos atuam na proteção das plantas contra estresses bióticos e abióticos (Hutzler *et al.*, 1998).

As imagens da ultraestrutura das células de *S. auriculata* evidenciaram que a principal alteração encontrada nos diferentes tratamentos salinos ocorreu nos

cloroplastos (Figura 2). Ali *et al.* (2004) ressaltam que a integridade do cloroplasto está vinculada à estabilidade da membrana externa, que raramente permanece intacta em altas concentrações salinas. O aumento dos espaços entre os tilacóides, a desorganização da grana, a presença de grãos de amido e de plastoglóbulos também foram encontrados no estudo com plantas de arroz *Oryza sativa* L. (Marcondes e Garcia, 2009) e em plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.) (Hernández *et al.*, 1995) submetidas ao estresse salino.

S. auriculata apresenta pêlos que se unem na extremidade superior formando uma estrutura semelhante a um batedor de ovo (Koch *et al.*, 2009). As estruturas dos tricomas somados a uma pequena quantidade de cera fazem com que as superfícies das folhas de *Salvinia* sejam extremamente hidrofóbicas e proporcionam um efeito positivo na sua flutuabilidade através da manutenção de um filme de ar quando as folhas estão debaixo d'água (Koch *et al.*, 2009). Essas estruturas foram observadas neste estudo, com o auxílio do microscópio de varredura nas plantas submetidas ao tratamento controle (Figura 3). A presença de cristais de cera, visualizados na superfície das células de *S. auriculata*, também foi observada na superfície das células de *Salvinia oblongifolia* (Koch e Barthlott, 2009) e na superfície das células de *Salvinia mínima* (Koch *et al.*, 2009). Segundo Ali *et al.*, (2004) a salinização em excesso modifica a atividade metabólica da parede celular, causando a deposição de diversos materiais que limitam a elasticidade da parede celular e diminui a pressão de turgor. Este fato pode estar relacionado à observação de que as superfícies das células de *S. auriculata* submetidas aos tratamentos salinos tornaram-se irregulares quando comparadas ao controle (Figura 4). Um súbito aumento na salinidade faz com que as células das folhas percam água e as dimensões celulares sejam alteradas, com redução de área e profundidade (Muuns e Tester, 2008).

Em conclusão, nós observamos que *S. auriculata* é uma planta sensível a altas concentrações salinas. Mesmo não se observando diferenças significativas entre os tratamentos para algumas avaliações foram notadas pelos resultados obtidos e pela visualização das plantas ao longo do experimento, modificações morfológicas e bioquímicas mais severas em *S. auriculata* submetidas a Na_2SO_4 do que em NaCl . Além disso, foi possível observar que as plantas submetidas aos tratamentos salinos com o sal Na_2SO_4 tiveram danos possivelmente irreversíveis como mostram as imagens de microscopia (Figura 2 e 4). Apesar da importância do S nas funções

estruturais e metabólicas nas plantas algumas vias intermediárias as quais formam sulfito, por exemplo, são tóxicas, e por isso as reações que ocorrem após a absorção do SO_4^{2-} com objetivo de sintetizar compostos orgânicos contendo S são fortemente reguladas pelas plantas (Davidian e Kopriva, 2010). O sulfito pode provocar a inativação das ligações S-S (Hänsch e Mendel, 2005) causando inativação de proteínas e por consequência redução no crescimento das plantas ou mesmo morte celular (Lang *et al.*, 2007). Provavelmente, altas concentrações de Na_2SO_4 podem ter afetado a regulação da assimilação de SO_4^{2-} em *S. auriculata* e a maior quantidade de Na^+ associado ao ânion SO_4^{2-} também agravou os efeitos negativos do Na_2SO_4 em *S. auriculata*.

Os resultados deste trabalho indicam que *S. auriculata* sofre alterações morfológicas e fisiológicas que as tornam incapazes de se desenvolver e proliferar em ambientes mesohalinos (salinidade entre 5 e 18 g sal.L⁻¹) e eurihalino (salinidade acima de 18 sal.L⁻¹).

Discussão Geral

O primeiro capítulo deste trabalho consistiu em experimentos com *S. auriculata* em câmara de germinação, com o objetivo de controlar as variáveis ambientais como temperatura, fotoperíodo e luminosidade e assim avaliar apenas a interferência da salinidade induzida por NaCl em *S. auriculata*. Entretanto a luminosidade na câmara de germinação é bem menor (100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) do que a luminosidade natural ($\sim 1.500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), o que pode ter interferido no desenvolvimento das plantas, e por conseguinte nas respostas destas à salinidade. Desta forma, posteriormente foram realizados experimentos em casa de vegetação, onde as variáveis ambientais naturais não foram controladas, e os resultados obtidos foram semelhantes à maioria dos trabalhos sobre plantas submetidas à salinidade.

Após experimentos realizados em câmara de germinação *S. auriculata* mostrou-se tolerante a moderadas concentrações salinas, equivalente a 50 mM ou cerca de 3g NaCl/L. Neste caso não foram observadas alterações que viessem a inibir o desenvolvimento dessa espécie em ambientes moderadamente salinos ou salobros, ao contrário, sua biomassa e teor de clorofila incrementaram sob as condições experimentais. Em concentrações salinas acima de 50 mM do sal NaCl, *S. auriculata*

mostrou sinais de estresse através da mudança de coloração das folhas que passaram a ter manchas de coloração bronze e necrose, redução da biomassa fresca e seca além de alterações no teor dos pigmentos fotossintéticos, aumento da produção de prolina e redução da produção de NO. O incremento no teor de pigmentos fotossintéticos, especialmente carotenóides e o incremento no teor de prolina constituem mecanismos para tentar diminuir estresse osmótico e oxidativo ocasionados pela salinidade. A redução da biomassa nas plantas submetidas à salinização com 100 e 150 mM ocorreu devido a perda do conteúdo de água que ao longo do tempo pode levar a redução da expansão foliar.

A redução da produção de NO nas raízes das plantas submetidas às concentrações salinas mais elevadas (100 e 150 mM) provavelmente ocorreu devido à difusão do NO para o meio externo. Neste caso, uma possível desestruturação da membrana plasmática que acontece quando as plantas não adaptadas à salinidade (glicófitas) são submetidas às elevadas concentrações salinas (Hansegawa *et al.*, 2000) pode também ter promovido esta maior liberação de NO. Ainda em relação ao estudo de NO, as plantas incubadas por duas horas na solução salina mostrou maior densidade de NO comparativamente às plantas com cinco dias de incubação, sugerindo a importância do NO como um sinalizador de maior atuação nos primeiros instantes de indução do estresse na planta, em resposta a esta condição. Adicionalmente, a maior concentração endógena de NO observada nas plantas submetidas à concentração de 50 mM em duas horas de incubação sugere que este aumento pode ser responsável pela sinalização do NO para a resposta de tolerância ao estresse. Neste tratamento, as plantas apresentaram um melhor desempenho em PF e PS após cinco dias de incubação, comparativamente às demais concentrações salinas testadas. Desta forma sugere-se que o NO pode estar envolvido na sinalização para tolerância ao estresse em *S. auriculata*, e que este sinal ocorre no início do processo, resultando na melhor adaptação das plantas à condição de estresse moderado verificado após cinco dias de incubação.

O estudo realizado na casa de vegetação com as concentrações de 0, 100 e 200 mM de NaCl e Na₂SO₄ permitiu a comparação dos efeitos destes sais sobre o conteúdo nutricional, teor de pigmentos fotossintéticos e de prolina além da anatomia e ultraestrutura foliar de *S. auriculata*. Neste estudo a salinidade afetou negativamente o conteúdo nutricional, o teor de clorofila *a* e *b* e carotenóides. O teor de prolina mostrou uma tendência ao aumento com o incremento da salinidade,

apesar de não ter sido verificada diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto, isso sugere que a salinidade gerou estresse oxidativo e osmótico ou hidrólise de proteínas compostas pelo aminoácido prolina. O aumento no teor de prolina está relacionado a tentativa desta espécie de tolerar o estresse salino.

Neste estudo também foram constatados efeitos negativos das concentrações salinas utilizadas sobre anatomia e ultraestrutura foliar de *S. auriculata*. Os resultados obtidos neste experimento foram mais próximos àqueles observados na literatura científica, possivelmente relacionado à maior semelhança nas condições de luminosidade. As concentrações salinas utilizadas danificaram a estrutura das membranas das organelas celulares como a mitocôndria e principalmente dos cloroplastos e induziu a produção de grãos de amidos como uma resposta ao estresse e uma forma de possibilitar a tolerância de *S. auriculata* à salinidade.

Os efeitos negativos da salinidade sobre a morfologia e fisiologia de *S. auriculata* nos permitem concluir que apesar da plasticidade desta planta que coloniza ambientes aquáticos de água doce e ambientes aquáticos das regiões próximas (~300 metros) do mar, provavelmente não colonizará ambientes aquáticos com salinidade acima de três psu.

O conhecimento das variações ambientais sobre as comunidades de macrófitas aquáticas contribui para o conhecimento da dinâmica dos ecossistemas aquáticos e para a proteção dos mesmos. Devido as vantagens da utilização de *S. auriculata* em tratamentos de efluentes, como bioindicadores de poluição em ecossistemas aquáticos, na mitigação de estresses oriundos das atividades humanas através do elevado poder de absorção de nutrientes e metais pesados, os estudos realizados com objetivo de conhecer os efeitos de fatores adversos sobre *S. auriculata* são importantes para a compreensão da distribuição desta espécie nos sistemas aquáticos.

A realização de experimentos com *S. auriculata* acondicionadas em água de lagoas costeiras, com gradientes de salinidade, também poderão contribuir para o melhor conhecimento da distribuição e respostas dessas plantas em relação à salinização.

Conclusão

- *S.auriculata* mostrou-se, sob as condições experimentais, tolerante a ambientes oligohalinos nos quais a salinidade varia de 0,5 a 5 g sal.L⁻¹. Nestes ambientes *S. auriculata* apresenta maior desenvolvimento da biomassa, integridade do aparato fotossintético que contribui para a ampla proliferação desta espécie.
- A salinidade acima de 5 g sal. L⁻¹ afeta negativamente fatores importantes para sobrevivência e desenvolvimento de *S. auriculata* como a fotossíntese, absorção de nutrientes, produção de NO e as estruturas das células foliares e de suas organelas.
- A redução do teor de pigmentos, desestruturação e degradação das membranas dos cloroplastos como resultados de elevadas concentrações salinas não permite a sobrevivência de *S. auriculata* em ambientes mesohalinos e eurihalinos que apresentam salinidade acima de 5 g sal. L⁻¹.
- A redução da assimilação dos nutrientes essenciais (Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, N e P) como consequência do antagonismo iônico e da competição iônica pela absorção desses elementos, também torna *S. auriculata* incapaz de colonizar ambientes com salinidade acima de 5 g sal. L⁻¹.
- O efeito negativo do sal Na₂SO₄ é mais intenso quando comparado ao NaCl. Além dos resultados indicarem este fato, mudanças na estrutura dos tricomas e coloração das folhas foram visíveis após poucas horas do acréscimo do sal a solução nutritiva.
- *S. auriculata* até poderá ser encontrada em lagoas costeiras, porém em locais com baixa salinidade.

BIBLIOGRAFIA

- AGHALEH, M., NIKNAM, V., EBRAHIMZADEH, H., RAZAVI, K. 2009. Salt stress effects on growth, pigments, proteins and lipid peroxidation in *Salicornia persica* and *S. europaea*. *Biologia Plantarum*. 53 (2): 243-248.
- ALEXANDER, H. D., DUNTON, K. H. 2006. Treated Wastewater Effluent as an Alternative Freshwater Source in a Hypersaline Salt Marsh: Impacts on Salinity, Inorganic Nitrogen, and Emergent Vegetation. *Journal of Coastal Research*. 22 (2): 377-392.
- ALI, G., SRIVASTAVA, PS, IQBAL, M. 1999 Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerants grown under NaCl stress. *Biol. Plant*. 42: 89-95.
- ALI, Y., ASLAM, Z., ASHRAF, MY. and TAHIR, GR. 2004. Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. *International Journal of Environmental Science & Technology*. 1 (3): 221-225.
- ALTEI, A., JEANSJEAN, R. 1993. Influence of osmotic shock and plasmolysis and phosphate uptake by excised corn roots. *Physiol. Veg*. 21: 39-47.
- AN, L., LIU, YANHONG., ZHANG, M., CHEN, T., WANG, X. 2005. Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. *Journal of Plant Physiology*. 162: 317-326.
- and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 51: 463-499.
- APSE, M.P., BLUMWALD, E. 2007. Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett*. 581:2247-2254.
- APSE, M.P., SOTTOSANTO, J.B., BLUMWALD, E. 2003. Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant J*. 36: 229-239.
- ASHARAF, M. AND SULTANA. 2000. Combination effect of NaCl salinity and N form on mineral composition of sunflower plants. *Biol. Plant*. 43: 615-619.
- ASHARI,-ESNA., GHOLAMI. 2010. The effect of increased chloride (Cl⁻) content in nutrient solution on yield and quality of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) FRUITS. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 18(1): 37-44.

- ASHRAF, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 17-42.
- ASHRAF, M., FOOLAD, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany.* 59 : 206-216.
- ASHRAF, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* 27: 84-93.
- ASLAM, M. 1992. Interaction of phosphate and salinity on the growth of rice (*Oryza sativa*). Post Doctoral Research Report, School of Biological Sciences, University of Sussex, UK. pp. 45.
- BALIERO, FC., DIAS, LE., FRANCO, AA, POLIDORO, JC., ANDRADE, AG. A fulmigação-extração na determinação do enxofre na biomassa microbiana do solo: revisão de literatura e estudo de caso. 2007, p. 1-41
- BAO, A.K., WANG, S.M., WU, G.Q., XI, J.J., ZHANG, J.L., WANG, C.M. 2008. Overexpression of the Arabidopsis H⁺-PPase enhanced the salt and drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Sci.* 176: 232-240.
- BARTELS, D., SUNKAR, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plants Sciences.* 24 (1): 23-58.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 39: 205-207.
- BELIGNI M.V., LAMATTINA, L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environment.* 24: 267-278.
- BLUMWALD, E., AHARON, G.S., APS, M.P. 2000. Sodium transport in plants cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1465: 140-151.
- BOHNERT, H.J., NELSON, D.E., JENSEN, R.G. 1995. Adaptation to environmental stress. *Plant Cel.* 7:1099-1111.
- BROCK, MA., NIELSEN, DL. and CROSLÉ, K. 2005. Changes in biotic communities developing from freshwater wetland sediments under experimental salinity and water regimes. *Freshwater Biology.* 50:1376-1390.
- BOZZOLA, J.J., RUSSEL, L.D. 1992. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists.* Jones & Bartlett, Boston. 542p.
- BURG, M.B., FERRARIS, J.D. 2008. Intracellular Organic Osmolytes: Function and regulation. *The journal of Biological Chemistry.* 283 (12): 7309-7313.

- CASABIANCA, M.L., LAUGIER, T., Posada, F. 1995. Pretoliferous wastewaters treatment with water hyacinths (Raffinerie de Provence, France): Experimental statement. *Waste Management*. 15 (8): 651-655.
- CENTRITTO, M., LORETO, F., CHARTZOULAKIS, K. 2003 The use of low [CO₂] to estimate dissusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt- stressed olive saplings. *Plant Cell Environ*. 26: 585-94.
- CHAVES, M.M., FLEXAS, J., PINHEIRO, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103: 551-560.
- CHEN HX, LI PM, GAO HY. 2007. Alleviation of photoinhibition by calcium supplement in salt-treated *Rumex* leaves. *Physiol Plant*. 129:386-396
- CHEN, Z.H., ZHOU, M.X., NEWMAN, I.A., MENDHAM, N.J., ZHANG, G.P., SHABALA, S. 2007. Potassium and sodium relations in salinised *Bailey* tissues as a basis of differential salt tolerance. *Funct Plant Biol* 34: 150-162.
- CHINNUSAMY, V., AND J.-K. ZHU. 2003. Plant salt tolerance. *Topics Curr. Genet*. 4:241-270.
- CHOLUJ, D., KARWOWSKA, R., CISZEWSKA, A., JASINSKA, M. 2008. Influence of long-term drought stress on osmolyte accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Acta Physiol Plant*. 30: 679-687
- CRAIN, C.M., SILLIMAN, B.R., BERTNESS, S.L., BERTNESS, M.D., 2004. Physical and biotic drivers of plant distribution across estuarine salinity gradients. *Ecology* 85, 2539-2549.
- CRAMER, G.R, LYNCH, J., LAUCHLI, A., EPSTEIN, E. 1987. Influx of Na⁺,K⁺, and Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings. *Plant Physiol*. 83:510–516
- CRATTAN, S.R., GRIEVE, C.M. 1992. Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 38 (4): 275-300.
- CRAWFORD, N. M. 2006. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*. 57 (3): 471-478.

- DANTAS, M. E., SHINZATO, E., MEDINA, A. I. M., SILVA, C. R., PIMENTEL, J., LUMBRERAS, J.F., CALDERANO, S.B., FILHO, A.C. 2000. Diagnóstico Geoambiental do Estado do Rio de Janeiro. http://www.cprm.gov.br/publique/media/artigo_geoambientalRJ.pdf.
- DAVIDIAN, J-C and KOPRIVA, S. 2010 Regulation of sulfate uptake and assimilation-the same or not the same? *Molecular Plant*. 3 (2): 314-325.
- DAVIES, TD. 2007. Sulphate toxicity to the aquatic moss, *Fontinalis antipyretica*. *Chemosphere*.66: 444-451.
- DAVIES, TD. Sulphate toxicity to freshwater organisms and molybdenum toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The University of British Columbia Vancouver, Canadá .,1996. Tese.
- DELLEDONNE M., XIA, Y., DIXON, R.A., LAMB, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. 394: 585-588.
- DELLEDONNE, M. 2005. NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol*. 8: 390-396.
- DELLEDONNE, M., MURGIA, I., EDERLE, D., SBICEGO, P.F., BIONDANI, A., POLVERARI, A., LAMB, C. 2002. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiol. Biochem*. 40: 605-610.
- DESIKAN, R., CHEUNG, M.K., BRIGHT, J., HENDSON, D., HANCOCK, J.T., NEILL, S.J. 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot*. 55:205-12.
- DOGANLAR, Z.B., DEMIR, K., BASAK, H., GUL, I. 2010. Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. *African Journal of Agricultural Research*. 5 (15): 2056-2065.
- DUCROCQ, C., BLANCHARD, B., PIGNATELLI, B., OSHIMA, H. 1999. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell. Mol. Life Sci*. 55: 1068-1077.
- EDGE, R., MCGARVEY, D.J., TRUSCOTT, T.G. 1997. The carotenoids a antioxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 41: 189-200.
- EGAN, T.P., UNGAR, I.A. 2001. Competition between *Salicornia europaea* and *Atriplex prostrata* (Chenopodiaceae) along an experimental salinity gradient. *Wetlands Ecology and Management*. 9: 457-461.

- ELSHEIKH, EAE AND WOOD, M. Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum L.*). Journal of Experiment Botany. 1990, vol. 41, p. 1263-1269.
- ESNA-ASHARI, M., GHOLAMI, M. 2010. The effect of increased chloride (Cl-) content in nutrient solution on yield and quality of strawberry (*Fragaria ananassa Duch.*) fruits. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 18(1): 37-44.
- ESTEVEES, B.S. Efeitos de variáveis ambientais sobre *Typha domingensis* PERS. em lagoas costeiras da região Norte Fluminense. Rio de Janeiro: UENF. Tese de doutorado.,2009, 131p.
- ESTEVEES, B.S., AND SUZUKI, M.S. 2008. Efeito da salinidade nas plantas. Oecol. Bras. 12 (4): 662-679.
- FALK, J., MUNNÉ-BOSCH, S., 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. J. Exp. Bot. 61. 1549-1566.
- FANG, Z., BOUWKAMP, J.C., SOLOMOS, T. 1998. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris L.* Journal of Experimental Botany. 49: 503-510.
- FLOWERS, T.J., HAJIBAGHERI, M.A., CLIPSON, N.J.W. 1986. Halophytes. The Quarterly Review of Biology: 61: 313-337.
- FRANKOVICH, T.A., MORRISON, D., FOURQUIREAN, J.W. 2011. Benthic macrophyte distribution and abundance in estuarine mangrove lakes and estuaries: relationships to environmental variables. Estuaries and coasts. 34:20-31.
- GARCÍA-MATA, C. LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptative plant responses against drought stress 2011. Plant Physiology. 126: 1196-1204.
- GHOULAM, G., FOURSRY, A., FARES, KHALID. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. Environmental and Experimental Botany 47: 39-50.
- GOBINATHAN, P., MURALI, P.V., PANNEERSELVAM, R. 2009. Interactive Effects of calcium chloride on salinity-induced proline metabolism in pennisetum typoidies. Advances in Biological Research. 3: 168-173.

- GOODMAN, AM., GANF, GG., DANDYB, G.C, MAIER, HR., GIBBS, MS. 2010. The response of freshwater plants to salinity pulses. *Aquatic Botany*. 93:59-67.
- GRATTAN, S.R., GRIEVE, C.M. 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*. 78: 127-157.
- GREENBERG, R., J. MALDONADO, and M. V. MCDONALD. 2006. Tidal marshes: a global perspective on the evolution and conservation of their terrestrial vertebrates. *Bioscience* 56:675–85.
- GREENWAY ,H., OSMOND, C. B. 1972. Salt Responses of Enzymes from Species Differing in Salt Tolerance. *Plant Physiol*. 49:256-259.
- GREENWAY, H., MUUNS, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Phys*. 31: 149-190.
- GUO, F.-Q., OKAMOTO, M., CRAWFORD, N.M. 2003 Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*. 302: 100-103.
- HÄNSCH, R AND MENDEL, RR. 2005. Sulfite oxidation in plant peroxisomes. *Photosynthesis Research*. 86: 337-343.
- HÄNSCH, R., LANG, C., RIEBESEEL, E., LINDIGKEIT, R., GESSLER, A., RENNENBERG, H. AND MENDEL, RR. 2006. Plant sulfite oxidase as novel producer of H₂O₂ combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(10): 6884-6888.
- HARE, PD. and CRESS, WA. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*., 1997, vol. 21, p. 79-102.
- HARO, R., BAÑUELOS, M.A., RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. 2010. High-affinity sodium uptake in land plants. 51 (1): 68-79.
- HART, B.T., BAILEY, P., EDWARDS, R., HORTLE, K., JAMES, K., MCMAHON, A., MEREDITH, C., SWADLING, K. 1991. A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. *Hydrobiologia* 210, 105–144.
- HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A., ZHU, J.K., BOHNERT, J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 51: 463-499
- HAWKESFORD, M.J. 2007. Sulfur in plants an ecological perspective. *Plant Ecophysiology*. 16: 1-15.
- HE, S., LI, J., YANG, H., XU Y., Hu E. 2010. Water Purification of High-salinity River by Floating Bed Grown Aquatic Plants. IEEEXPLORE Digital library, 2010.

- HERNÁNDEZ, JA., OLMOS, E., CORPAS, FJ., SILVA, F., DEL RÍO, L.A. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science.*, 1995, vol. 105, p. 151-167.
- HERNANDEZ ,J. A., A., JIMENEZ C. A., ALARCON J. J., SEVILLA, F. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.* 141: 241-251.
- HERNÁNDEZ, J.A., JIMÉNEZ, A., MULLINEAUX, P., SEVILLA, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment.* 23: 853 - 862.
- HOAGLAND, DR. and ARNON, DI. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular.*, 1950, vol 347, p.1-32.
- HOBBS, R.J. Effects of landscape fragmentation on ecosystem processes in the Western Australian wheatbelt. 1993. *Biological Conservation.* 64 (3): 193-201.
- HORIE, T., COSTA, A., KIM, T.H, HAN, M.J., HORIE, R., LEUNG, H.Y., MIYAO, A., HIROCHIKA, H., AN G., SCHROEDER, J.I. 2007. RiceOsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO J.* 26: 3003-3014.
- HOWARD, R.J. AND MENDELSSOHN, I.A. 1999. Salinity as a constraint on growth of oligohaline marsh macrophytes.I. Species variation in stress tolerance. *American Journal of Botany.* 86 (6): 785-794.
- HOWARD, R.J., MENDELSSOHN, I.A. 1999. Salinity as a constraint in growth of oligohaline marsh macrophytes.I. Species variation in stress tolerance. *American Journal of Botany.* 86 (6): 785-794.
- HU, Y. and SCHMIDHALTER, U. 2005. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J.Plant Nutr. Soil Sci.*168: 541-549.
- HUTZLER, P., FISCHBANCH, R., HELLER, W., JUNGBLUT, TP., REUBER, S., SCHMITZ, R., VEIT, M., WEISSENBO, G. and SCHNITZLER, JP. 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany.*49 (323): 953-965.
- JACKSON, M.L. 1965. *Soil chemical analysis.* New Jersey: Prentice Hall, 498p.
- JAMPEETONG, A. and BRIX, H. 2009. Effects of NaCl salinity on growth, morphology, photosynthesis and proline accumulation of *Salvinia natans*. *Aquatic Botany.*91:181-186.

- JASID, S., GALATRO, A., VILLORDO, J.J., PUNTARULO,S., SIMONTACCHI, M. 2009. Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. *Plant Science*. 176:662-668.
- KAYMAKANOVA, M. and STOEVA, N. 2008. Physiological reaction of bean plants (*Phaseolus vulg. L*) to salt stress. *Gen. Appl. Plant Physiology*. 34: 177-188.
- KENKEL, N.C., MCILRAITH, A.L., BURCHILL, C.A., JONES, G. 1991. Competition and the response of three plant species to a salinity gradient. *Can.J.Bot.* 69: 2497-2502.
- KHAN, M.A.,DUKE, N.C. 2001. Halophytes - A resource for the future *Wetlands Ecology and Management* 6: 455-456.
- KHAN, NA. NaCl-inhibited chlorophyll synthesis and associated changes in ethylene evolution and antioxidative enzyme activities in wheat. 2003/2004. *Biol. Plant.*47: 437-440.
- KIM S.Y., LIM J., PARK M.R., KIM Y.J., PARK T.I., SEO Y.W., CHOI K.G., YUN S.J., 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in Bailey roots under saline stress. *J Biochem Mol Biol*. 38(2): 218-24.
- KIPRIYANOVA, L.M., YERMOLAEVA, N.I., BEZMATERNYKH, D.M., DVURECHENSKAYA, S.Y., MITROFANOVA, E.Y. 2007. Changes in the biota of Chany lake along a salinity gradient. *Hidrobiologia*. 576: 83-93.
- KOCH, K. and BARTHLOTT, W. 2009. Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials.*Phil. Trans. R. Soc.* 367: 1487-1509.
- KOCH, K., BHUSHAN, B., BARTHLOTT, W. 2009. Multifunctional surface structures of plants: An inspiration for biomimetics. *Progress in Materials Science*. 54: 137-178.
- KOZLOWSK, T. T. 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology Monograph*. 1: 1-17.
- LACERDA, C.H.F., HAYASHI, C., SOARES C. M., FERNANDES, C. E. B. 2010. Influence of aquatic plants on the predation of *Piaractus mesopotamicus* larvae by *Pantala flavescens*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá*. 32 (2): 147-151.

- LAMATTINA, L., GARCÍA-MATA, C., GRAZIANO, M. AND PAGNUSSAT, G. 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 109-136.
- LAMMOTTE, O., COURTOIS, C., BARNAVON, L., PUGIN, A., WENDHENNE, D. 2005. Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta* 221: 1-4.
- LANG, C., POPKO, J., WIRTZ, M., HELL, R., HERSCHBACH, C., KREUZWIESER, J., RENNENBERG, H., MENDEL, RR AND HÄNSCH, R. 2007. Sulphite oxidase as key enzyme for protecting plants against sulphur dioxide. *Plant, Cell and Environment.* 30: 447-455.
- LARCHER, W. 1995 *Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups.* Springer-Verlag, Berlin. 506 p.
- LEE, T.M., LIU, C.H., MAATHUIS, F.J.M., AMTMANN, A. 1999. Correlation of decreased calcium contents with proline accumulation in the marine green macroalga *Ulva fasciata* exposed to elevated NaCl contents in seawater. *Journal of Experimental Botany.* 341 (50): 1855-1862.
- LESHEN, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. 1996. *Plant Growth Regulators.* 18 (3): 155-159.
- LEUSTEK, T. and SAITO, K. 1999. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology.* 120: 637-643.
- LIMA, MGS., LOPES, NF., BACARIN, MA., MENDES, CR. 2004. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. *Bragantia, Campinas.* 63 (3): 335-340.
- LOKHANDE, V.H., NIKAM, T. D., PATADE, V.Y., AHIRE, M. L., SUPRASANNA, P. 2011. Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and in vitro growth responses in *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 104:41-49.
- LÓPEZ-CARRIÓN, A.I., CASTELLANO, R., ROSALES, M.A., RUIZ, J.M., ROMERO, L. 2008. Role of nitric oxide under saline stress: implications on proline metabolism. *Biologia Plantarum* 52 (3): 587-591.
- LUO, Q., YU, B., LIU, Y. 2005. Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. *Plant Physiol* 162: 1003-1012, 2005.

- MAATHUIS, F.J.M., AMTMANN, ANNA. 1999. K^+ Nutrition and Na^+ Toxicity: The Basis of Cellular K^+/Na^+ Ratios. *Annals of Botany* 84: 123-133.
- MAGALHÃES, J.R., MODOLO, L.V., SOUZA, S.R., FRESCHI, L., FRANÇA, M.G.C., LEONOR, F., SILVA, I.M. 2006. Origem do óxido nítrico em plantas e seu papel como sinalizador de estresses. Livro: *Nutrição Mineral de Plantas*, Ed. Fernandes, M.S. 432p.
- MAHAJAN, S., PANDEY, G.K., TUTEJA N. 2008. Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 471 (2008) 146–158.
- MALAVOLTA, E., VITTI, G.C., OLIVEIRA, S.A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 319p.
- MANSOUR, M.M.F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum*. 43 (4): 491-500.
- MANSOUR, M.M.F., SALAMA, K.H.A. 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany*. 52: 113-122
- MARCONDES, J. and GARCIA, AB. Aspectos citomorfológicos do estresse salino em plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Arq. Ist. Biol.*, 2009, vol. 76, no. 2, p. 187-194.
- MASKRI, A., L. AL-KHARUSI AND H. AL-MIQBALI, 2010. Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. *Int. J. Agric. Biol.* 12: 377–380
- MISRA, A., SAHU, S.M, MISRA, M., RAMASWAMY, N.K., DESAI, T.S. 1999. Sodium chloride salt stress-induced changes in thylakoid pigment protein complexes, photosystem II activity and thermoluminescence glow peaks. *Z Naturforsch.* 54: 640-644.
- MOONS, A., BAUW, G., PRINSEN, E., VAN MONTAGU, M. AND VAN DER STRAETEN, D. 1995. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. *Plant Physiol*, 107:177-186.
- MUHAMMED, S., AKBAR, M., and NEUE, H.V. 1987. Effect of Na/Ca and Na/K ratios in saline culture solution on the growth and mineral nutrition of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil*, vol. 104, p. 57-62.

- MUNNS, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25:239-250.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. 2002. *Plant Cell Environ*. 25: 239-250.
- MUNNS, R., JAMES, R.A., LÄUCHLI, A., 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57: 1025-1043.
- MUNNS, R., TESTER, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*59: 651-81.
- MUSCHAL, M. 2006. Assessment of risk to aquatic biota from elevated salinity - A case study from the Hunter River, Australia Monika. *Journal of Environmental Management*. 79: 266-278.
- MUSCOLO R., REBETZKE G.J., HUSAIN S., JAMES R.A., HARE R.A., 2003. Genetic control of sodium extrusion in durum wheat. *Austra.. J. Agr. Res.* 54: 627-635.
- NAHEED, G., SHAHBAZ, M., AKRAM, N.A. 2008. Interactive effect of rooting medium application of phosphorus and NaCl on Plant biomass and mineral nutrients of rice (*Oryza Sativa L.*). *Pak. J. Bot.* 40 (4): 1601-1608.
- NAIDOO, G. 1987. Effects of salinity and nitrogen on growth and plant water relations in the mangrove *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. *New Phytol.* 107: 317-326.
- NAVARRO, J.M., BOTELLA M. A., VICENTE, A.C. 2001. Phosphorus uptake and translocation in salt-stressed melon plants. *Plant Physiol.* 158: 375-381.
- NDAKIDEMI, P.A., MAKOI, J.H.J.R. 2009. Effect of NaCl on the productivity of four selected common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris L.*) *Scientific Research and Essay*. 2009. 4 (10): 10066-1072.
- NEILL, S.J., DESIKAN, R., HANCOCK, J.T. 2003. Nitric oxide signaling in plants. *New Phytol.* 159: 11-35.
- 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: 806-11.
- NEUMANN, P. 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant, Cell and Environment*. 20: 1193-1198

- NIAZ, M., RASUL, E. 1998. Aquatic macrophytes as biological indicators for pollution management studies. *Pakistan Journal Sciences*. 1 (4): 332-334.
- NIAZ, M., RASUL, E. 1998. Aquatic macrophytes as biological indicators for pollution management studies. IV: Effects of salts present in factory effluent water on chemical and biochemical composition of *Eichhornia crassipes* and *pistia stratiotes*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 1(4): 332-334.
- NIKIFOROVA, VJ., BIELECKA, M., GAKIÈRE, B, KRUEGER, S., RINDER, J., KEMPA, S., MORCUENDE, R., SCHEIBLE, W.R., HESSE, H AND HOEFGEN, R. Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. *Amino Acids.*, 2006, vol, 30, p.173-183.
- NIU, X., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M., PARDO, J.M. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol*. 109: 735-742.
- NUBLAT, A., DESPLANS, J., CASSE, F., BERTHOMIEU, P. 2001. *sas1*, an *Arabidopsis* mutant overaccumulating sodium in the shoot, shows deficiency in the control of the root radical transport of sodium. *Plant Cell*. 13: 125-137.
- OHTSUKA, T., ITO, H., TANAKA, A. 1997. Conversion of chlorophyll b to Chlorophyll a and the assembly of chlorophyll with apoproteins by isolated-chloroplasts. *Plant Physiol*. 113: 137-147.
- OMOTO, E., KAWASAKI, M., TANIGUCHI, M., MIYAKE, H. 2009. Salinity Induces Granal Development in Bundle Sheath Chloroplasts of NADP-Malic Enzyme Type C4 Plants. *Plant Prod. Sci*. 12 (2): 199-207.
- OWENS, S. Salt of the earth. 2001. *EMBO Rep*. 2: 877-879.
- PAGTER, M., BRAGATO, C., MALAGOLI, M., BRIX, H. 2009. Osmotic and ionic effects of NaCl and Na₂SO₄ salinity on *Phragmites australis*. *Aquatic Botany*.90: 43-51.
- PANTOJA, O., DAINY, J., BLUMWALD, E. 1989. Ion channels in vacuoles from halophytes and glycophytes. *FEBS Lett*. 255:92-96.
- PARIDA, A., DAM, A.B., DAM, O. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true *Mangrove*, *Bruguiera parviflora*, in hydroponics cultures. *Journal of Plant Biology*. 45 (1): 28-36.
- PARIDA, A., DAS, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 324-349.

- PARIDA, A.K., DAS, A.B. 2004. Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorus metabolism in a true mangrove *Bruguiera paeviflora* grown under hydroponic culture. *J. Plant Physiol.* 161: 921-928.
- PARRE, E., GEITMANN, A. 2005. More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol* 137:274-286.
- PEDROSO, M.C., DURZAN, D.J., 2000. Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoë* leaves. *Anna Bot.* 86: 983-994.
- PETER, C.R., BURDICK, D. M., 2010. Can plant competition and diversity reduce the growth and survival of exotic *Phragmites australis* invading a tidal marsh? *Estuaries and Coasts.* 33: 1225-1236.
- PRYOR, W.A., SQUADRITO, G.L. Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 1995; 9:1157-1168.
- RAHMAN, M.S., MATSUMURO, T., MIYAKE, H. AND TAKEOKA, Y. 2000. Salinity-induced ultrastructural alterations in leaf cell of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* 3 : 422-429.
- RAINS, DW and EPSTEIN, E. 1967. Sodium absorption by Bailey roots: role of dual mechanisms of alkali cation transport. *Plant Physiol.* 42: 314-318.
- RENAULT, S., CROSER, C., FRANKLIN, JA., ZWIAZEK, JJ. 2009. Effects of NaCl and Na₂SO₄ on red-osier dogwood (*Cornus stolonifera* Michx) seedlings. *Plant Soil.* 314: 133-141.
- RENGASAMY, P. 2006. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany.* 57(5): 1017-1023.
- ROACHE, M.C., BAILEY, P.C., BOON, P.I. 2006. Effects of salinity on the decay of the freshwater macrophyte, *Triglochin procerum*. *Aquatic Botany.* 84 (1): 45-52.
- ROUT, NP. AND SHAW, BP. 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: Ionic relation and interaction. *Biologia Plantarum.* 44 (1): 95-99.
- RUAN, H., SHEN, W., Ye, M., XU, L. 2002. Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Chinese Science Bulletin.* 47 (8): 467-473.
- SAIRAM, R.K., TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. 2004. *Current Science.* 86 (3): 407-421.
- SALISBURY, F.B., ROSS, C.W. (1992). *Plant physiology.* Wadsworth Publishing Company, Belmont. SCHALLENBERG, M., HALL, C.J., BURNS, C.W. 2003.

- Consequences of climate-induced salinity increases on zooplankton abundance and diversity in coastal lakes. *Mar Ecol Prog Ser.* 251: 181-189.
- SCHAPIRE, A.L., VOIGT, B., JASIK, J., ROSADO, A., LOPEZ-COBOLLO, R., MENZEL, D., SALINAS, J., MANCUSO, S., VALPUESTA, V., BALUSKA, F. AND BOTELLA, M.A. 2008. Arabidopsis Synaptotagmin 1 Is Required for the Maintenance of Plasma Membrane Integrity and Cell Viability. *The Plant Cell.* 20:3374-3388.
- SCHEUMANN, V.,SCHOCH, S.,RÜDIGGER, W. 1998. Chlorophyll a formation in the chlorophyll b reductase reaction requires reduced ferredoxin. *The Journal of Biological Chemistry.* 52 (273): 35102-35108.
- SEN, H.S. AND BAL. A.R. 2009.Plants Facing Nutritional Disorders in Coastal Saline Soils and Management Options. *In: Singh, G., Qadar, A., Yaduvanshi, N.P.S. Dey, P.Enhancing Nutrient Use Efficiency in Problem Soils. Central Soil Salinity Research Institute KARNAL - 132 001Haryana. India: Ed. Icar.* 52-83.
- SHABALA, B., CUIN, T.A. 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant .*133: 651-69.
- SHANI U., BEN-GAL, A. 2005. Long-term response of grapevines to salinity: Osmotic effects and ion toxicity. *American Journal of Enology and Viticulture.* 56: 148-154.
- SHARMA, PK. And HALL, DO. 1991. Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in Bailey and sorghun. *Journal of Plant Physiology, Stuttgart.*138 (5): 614-619.
- SHARPE, P. J. AND BALDWIN, A. H. 2009. patterns of wetland plant species richness across estuarine gradients of chesapeake bay. *Wetlands.*29 (1): 225-235.
- SHI, Q., DING, F., WANG, X., WEI, M. 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry.* 45: 542-550.
- SILVA, C., MARTÍNEZ, V., CARVAJAL, M. 2008. Osmotic versus toxic effects of NaCl on peppers plants. *52 (1):* 72-79.
- SOARES, D. C. F., OLIVEIRA, E. F., SILVA, G. D. F., DUARTE, L. P., POTT, V. J., FILHO, S. A. V. 2008. *Salvinia auriculata*: Aquatic bioindicator studied by instrumental neutron activation analysis (INAA) *Applied Radiation and Isotopes.* 66: 561–564

- SONG, J., CHEN, M., FENG, G., JIA, Y., WANG, B., ZHANG, F. 2001. Effect of salinity on growth, ion accumulation and the roles of ions in osmotic adjustment of two populations of *Suaeda salsa*. *Plant and Soil*. 233: 261-268.
- SOPANDIE, D., KAWASSAKI, T., MORITSUGU, M. 1995. Effect of calcium on the growth and ion uptake in NaCl-stressed plants. *Bul. Agron.* 23 (1): 42-44. Spinach (*Ipomoea aquatica*). *Int. J. Agric. Biol.* 12 (2): 211-216
- STOEVA, N., KAYMAKANOVA, M. 2008. Effect of salt stress on the growth and photosynthesis rate of bean plants (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Central European Agriculture*. 9 (3): 385-392.
- SUÑE, N., SÁNCHEZ, G., MALAGOLI, M., BRIX, H. 2007. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environ. Poll.* 90: 467-473.
- SUZUKI, M.S., FIGUEIREDO, R.O., CASTRO, S.C., SILVA, C.F., PEREIRA, E.A., SILVA, J. A., ARAGON, G.T. 2002. Sand bar opening in a coastal lagoon (Iquipari) in the northern region of Rio de Janeiro state: hydrological and hydrochemical changes. *Braz.J.Biol.* 62 (1): 51-62.
- SUZUKI, M.S., OVALLE, A.R.C., PEREIRA, E.A. 1998. Effects of sand bar openings on some limnological variables in a hypertrophic tropical coastal lagoon. Brazil. *Hydrobiologia*. 368: 111-122.
- SZABADOS, L., SAVOURÉ, A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 15 (2): 89-97.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Ed. Artimed. 2009. 819 p.
- TANAKA, A. Y., TSUJI, H. 1981. Changes in chlorophyll a and b content in dark-incubate cotyledons excised from illuminated seedlings. *Plant Physiol.* 68: 567-570.
- TANAKA, A. Y., YAMAMOTO, Y., AND TSUJI, H. 1991. Formation of chlorophyll-protein complexes during greening. 2. Redistribution of chlorophyll among apoproteins. *Plant Cell Physiol.* 32:195-204.
- TEIXEIRA, J., FIDALGO, F. 2009. Salt stress affects glutamine synthetase activity and mRNA accumulation on potato plants in an organ-dependent manner. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 807-813.
- TERRY, N. WALDRON, L.J. 1984. Salinity, photosynthesis, and leaf growth. *California Agriculture*, 38-39.

- THOMPSON, D.S. 2005. How do cell walls regulate plant growth? *J Exp Bot* 56: 2275-2285.
- TOLEDO, J.J., PENHA, J. 2011. Performance of *Azolla caroliniana* Willd. and *Salvinia auriculata* Aubl. on fish farming effluent. *Braz. J. Biol.* 71 (1): 37-45.
- TORRELLI, W.A., RICE, L.A. 1986. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. *Plant and Soil.* 93: 241-247.
- TORRELLI, W.A., RICE, L.A. 1986. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. *Plant and Soil.* 93: 241-247.
- TUNA, A.L., KAYA, C., ASHRAF, M., ALTUNLU, H., YOKAS, I., YAGMUR, B. 2007. The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany.* 59: 173-178.
- TURAN, M.A., ELKARIM, A.H.A., TABAN, N., TABAN, S. 2009. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant. *African Journal of Agricultural Research.* 4 (9): 893-897.
- TUTEJA, N., MAHAJAN, S. 2007. Calcium Signaling Network in Plants. *Plant Signaling & Behavior.* 2 (2): 79-85
- UCHIDA, A., JAGENDORF, A.T., HIBINO, T., TAKABE, T., TAKABE, T. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science.* 163: 515-523.
- UPADHYAY, R.K. and PANDA, S.K. 2005. Salt tolerance of two aquatic macrophytes, *Pistia stratiotes* and *Salvinia molesta*. *Biologia plantarum.* 49 (1): 157-159.
- URANO, K., KURIHARA, Y., SEKI, M., SHINOZAKI, K. 2010. 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology.* 13:132-138.
- VERBRUGGEN, N. and HERMANS, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids.* 35: 753-759.
- VERNON, D. M., BOHNERT, H. J. 1992. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *The EMBO Journal.* 11(6): 2077- 2085.

- VISWANATHAN CHINNUSAMY AND JIAN-KANG ZHU. Plant salt tolerance Topics in Current Genetics, Vol.4. H.Hirt, K.Shinozaki (Eds.) Plant Responses To Abiotic Stress.
- VITAL, S.A., FOWLER, R. W., VIRGEN, A., GOSSETT, D.R., BANKS, S.W., RODRIGUEZ, J. 2008. Opposing roles for superoxide and nitric oxide in the NaCl stress-induced upregulation of antioxidant enzyme activity in cotton callus tissue. *Environmental and Experimental Botany*. 62: 60–68.
- VYSOTSKAYA, L., HEDLEY, P.E., SHARIPOVA, G., VESELOV, D., KUDOYAROVA, G., MORRIS, J., JONES, H.G. Effect of salinity on water relations of wild Bailey plants differing in salt tolerance. *AoB PLANTS* 1-8.
- WARWICK, N.W.M., AND BAILEY, P.C.E. 1997. The effect of increasing salinity on the growth and ion content of three non-halophytic wetland macrophytes. *Aquatic Botany*. 58 (1): 73-88.
- WATSON, E.B., BYRNE, R. 2009. Abundance and diversity of tidal marsh plants along the salinity gradient of the San Francisco estuary: implications for global change ecology. *Plant Ecol*. 205: 113-128.
- WATSON, R., PRITCHARD, J. AND MALONE, M. 2001. Direct measurement of sodium and potassium in the transpiration stream of salt-excluding and non-excluding varieties of wheat. *Journal of Experimental Botany*. 52 (362): 1873-1881.
- WELLBURN, AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. 144 (3):307-313.
- WENDEHENNE, D., PUGIN, A., KLESSIG, D., DURNER, J. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci*. 6: 177-183.
- WILLIAMS, WD. 1999. Salinisation: A major threat to water resources in the arid and semi-arid regions of the world.4:85-91.
- XINWEN, X., HAILIANG, X., YANGLING, WANG., XIAOJING, W., YONGZHI, Q., BO, X. 2008. The effect of salt stress on the chlorophyll level of the main sand-binding plants in the shelterbelt along the Tarim Desert Highway. *Chinese Science Bulletin*. 53: 109-111.
- XU, J., WANG, W., YIN, H., LIU, X., SUN, H., MI, Q. 2010. Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of

- Medicago truncatula seedlings under cadmium stress. *Plant Soil* (2010) 326:321-330.
- YAMANE, K., KAWASAKI, M., TANIGUCHI, M. AND MIYAKE, H. 2003. Differential effect of NaCl and polyethylene glycol on the ultrastructure of chloroplasts in rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 160 : 573-575.
- YAMASAKI, H.2000. Nitrite-dependente nitric oxide production pathway: implicatíons for involvement of active nitrogen species in photoinhition in vivo. *Series-B Biol. Sci.* 355: 1477-1488.
- YANCEY, P.H. 2005. Organic osmolytes compatible metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stress. *The Journal of Experimental Biology.* 208: 2819-2830.
- YAO, X., HORIE, T., XUE, S., LEUNG, H-Y., KATSUHARA, M., B, D.E., WU, Y., AND SCHROEDER, J.I. 2010 Differential sodium and potassium Transport Selectivities of the Rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 Transporters in Plant Cells¹, [C]IOA]. *Plant Physiology.* 152: 341-355.
- YOKOI, S., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P. M. 2002. Salt Stress Tolerance of Plants. *JIRCAS Working Report.* 25-33
- YOUSIF, B. S., NGUYEN, T. N., FUKUDA, Y. , HAKATA H. , OKAMOTO, Y., MASAOKA, Y., SANEOKA, H. 2010. Effect of Salinity on Growth, Mineral Composition, Photosynthesis and Water Relations of Two Vegetable Crops; New Zealand Spinach (*Tetragonia tetragonioides*) and Water
- ZEDLER, J.B., NELSON, P., ADAM, P. 1995. Plant community organization in new south wales saltmarshes: species mosaics and potential causes. *Wetlands (Australia) Plant Community Organization I NsW Saltmarshes.* 14: 1-18.
- ZHANG, H.X., BLUMWALD, E. 2001. Transgenic salt tolerant tomato plant accumulate salt in the foliage not in the fruit. *Nat Biotechnol.* 19:765-768.
- ZHANG, J.L., FLOWERS, T. J., WANG S.M. 2010. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant Soil.* 326:45–60
- ZHANG, Y.Y., WANG, L.L., LIU, Y.L., ZHANG, Q., WEI, Q.P., ZHANG, W.H. 2006. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* 224: 545-555.

- ZHAO, L., ZHANG, F., GUO, J., YANG, Y., LI, B., ZHANG, L. 2004. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol.* 134: 849-857.
- ZHAO, M.G., TIAN, Q.T., ZHANG, W.H. 2007. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144:206-217.
- ZHU, J.K. 2000. Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance Using *Arabidopsis* Plant Physiology. 124: 941-948.
- ZHU, J-K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 441-445.