

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

RESPOSTA BIOQUÍMICA DE CITRINOS SUBMETIDOS
A STRESSE SALINO

MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

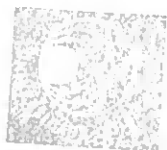
SÍLVIA RUTE PEREIRA DE OLIVEIRA

FARO

(2005)

Resposta bioquímica de
citrinos submetidos a
stress salino * Oliveira,





UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

**RESPOSTA BIOQUÍMICA DE CITRINOS SUBMETIDOS
A STRESSE SALINO**

MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

SÍLVIA RUTE PEREIRA DE OLIVEIRA

FARO

(2005)

3559T.

19 05 06 66170
66 577
OLI * Res

1

NOME: Sílvia Rute Pereira de Oliveira

DEPARTAMENTO: Laboratório de Engenharia Biológica da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

ORIENTADOR: Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

DATA: 24 de Março de 2006

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Resposta Bioquímica de Citrinos Submetidos a Stresse Salino

JÚRI:

Professora Doutora Deborah Mary Power, Professora Catedrática da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve.

Doutora Maria Emília Lima Costa, Professora Associada da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve.

Doutor António Dominguez Moreno, Professor Auxiliar do Departamento de Ciencias Agroforestales de la Universidad de Huelva – Espanha.

*“Se chegarmos ao fim da linha, o espírito humano
definha e morre.”*

(Stephen Hawking)

Aos meus Pais

Agradecimentos

O gosto pela ciência e investigação, inculcido desde cedo, permitiu-me chegar até aqui. A presença de certas pessoas na minha vida, tornaram este percurso ainda mais gratificante. Por isso, quero prestar o meu profundo agradecimento, áqueles que sempre me apoiaram e acompanharam no decorrer deste trabalho:

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Isabel Plântier, por ter-me despertado desde cedo o gosto pela investigação.

Agradecer à Professora Maria Emília Lima Costa, pela orientação e apoio prestados no decorrer do trabalho e por me proporcionar as condições de trabalho necessárias.

À Professora Isabel Maria Saraiva de Carvalho, pela co-orientação e disponibilidade sempre que necessária.

Ao Professor Amílcar Duarte, pelos ensinamentos e colaboração prestada no trabalho prático bem como na correção desta dissertação.

Ao laboratório de Engenharia Biológica, da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, onde realizei todo o estudo inerente à dissertação.

Ao laboratório de Bioquímica, da Faculdade de Ciências e Tecnologia por permitirem, sempre que necessário, a utilização de equipamento.

A todos os docentes do Mestrado em Biotecnologia, agradeço a transmissão de conhecimentos.

Gostaria de agradecer à Sara, pelo bom ambiente de trabalho criado no laboratório e por todo o apoio que me deu na conclusão do mesmo.

Um agradecimento especial à Andrea e à Mónica, pela amizade e companheirismo permanentemente demonstrados. Obrigado pelos bons momentos proporcionados, por ouvirem os meus desabafos e por serem as amigas que são.

Aos meus Pais, por me apoiarem incondicionalmente nas decisões mais importantes que tive de tomar, no decorrer da minha vida. Obrigado pelo apoio, carinho, e compreensão no tempo dispensado na realização deste trabalho.

Às minhas irmãs Paula e Mónica, pelos anos passados e por se mostrarem sempre prestáveis, apoiando-me nos momentos difíceis.

Um agradecimento muito especial ao Rui, obrigado por estares presente sempre que precisei, por me fazeres rir quando não tinha vontade. Obrigado, pela compreensão, dedicação, amizade e apoio demonstrados, e especialmente por me mostrares o caminho da razão.

A todos os amigos que se cruzaram na minha vida, e me acompanharam ao longo deste tempo.

Obrigado a todos!

ABREVIATURAS

- NaOCl - hipoclorito de sódio
- KCl - cloreto de potássio
- CaCl₂ - cloreto de cálcio
- NaCl - cloreto de sódio
- HClO₄ - ácido perclórico
- HNO₃ - ácido nítrico
- EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
- PVP - polivinilpirrolidona
- NBT - nitrobluetetrazolium
- H₂O₂ - peróxido de hidrogénio
- TCA - ácido tricloroacético
- BHT - hidroxitoluenobutilado
- TBA - ácido 2-tiobarbitúrico
- PS - peso seco
- PF - peso fresco
- APX - ascorbato peroxidase
- SOD - superóxido dismutase
- CAT - catalase

Resumo

Este trabalho teve como objectivos principais, estudar o efeito da salinidade em porta-enxertos e cultivares de citrinos, assim como o efeito do silício na redução do stresse salino. No estudo do efeito da salinidade sobre diferentes cultivares *in vivo*, foram testados valores de condutividade eléctrica de 1, 3 e 6 dS/m. Os níveis de Na^+ e Cl^- aumentaram significativamente ($P < 0,05$) nas cultivares ‘Nova’/Citranjeira Carrizo, ‘Nova’/*Citrus macrophylla*, ‘Valencia late’/*Citrus macrophylla* e ‘Nova’/*Citrus macrophylla*, enquanto que os de K^+ diminuíram. A actividade específica dos enzimas SOD, CAT e APX não foi significativamente afectada ($P < 0,05$). No ensaio *in vitro* com discos de folhas de cultivares, a aplicação de 6 dS/m aumentou significativamente ($P < 0,05$) os níveis de Na^+ na cultivar ‘Nova’/Citranjeira Troyer B2, mas não na cultivar ‘Valencia late’/Citranjeira Troyer B2. As concentrações de K^+ e Cl^- , e a actividade específica da SOD, CAT e APX, não foram afectadas pela salinidade nem pela aplicação de 2,5 mM de silício. No estudo *in vivo* com porta-enxertos, foram aplicadas as soluções de 1, 3 e 6 dS/m de NaCl, com ou sem 2,5 mM de silício. A Tangerineira Sunki, foi a que melhor respondeu à presença de NaCl e silício. Neste porta-enxerto a concentração de Na^+ foi aumentando significativamente ($P < 0,05$), enquanto que a de K^+ diminuiu. Em ambos os porta-enxertos, T. Sunki e C. Troyer, a actividade específica da SOD, CAT e APX, aumentou com o tempo de exposição ao NaCl e na presença de silício.

Palavras-chave: Citrinos, stresse salino, silício, enzimas antioxidantes

Abstract

The main goal of this work, was to study the effect of salinity in rootstocks and cultivated varieties of *Citrus*, as well as the effect of silicium, in the reduction of saline stress. In the study of salinity effects in different cultivated varieties, the values of conductivity tested were 1, 3 e 6 dS/m. The levels of Na^+ and Cl^- significantly increased ($P < 0,05$) in 'Nova'/Citranjeira Carrizo, 'Nova'/*Citrus macrophylla*, 'Valencia late'/*Citrus macrophylla* and 'Nova'/*Citrus macrophylla*, while K^+ decreased. The specific activity of SOD, CAT and APX wasn't significantly affected ($P < 0,05$). In the *in vitro* study with cultivated varieties leaf discs, the application of 6 dS/m significantly increased ($P < 0,05$) Na^+ concentration of 'Nova'/Citranjeira Troyer B2, but not of 'Valencia late'/Citranjeira Troyer B2. The concentrations of K^+ and Cl^- , has well as SOD, CAT and APX specific activities were not affected by salinity, neither by the application of 2,5 mM of silicium. In the *in vivo* study with rootstocks, the treatment solutions applied were 1, 3 and 6 dS/m of NaCl, with or without 2,5 mM of silicium. The Tangerineira Sunki, was the one who better respond to NaCl and silicium presence. In this rootstock Na^+ concentration significantly increased ($P < 0,05$), while K^+ decreased. In both rootstocks, T. Sunki and C. Troyer, the specific activity of SOD, CAT and APX increased with exposure time to NaCl and in the presence of silicium.

Keywords: *Citrus*, salt stress, silicium, antioxidant enzymes

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
I. Introdução	1
<hr/>	
1. Enquadramento e objectivos do trabalho	2
2. Salinidade	3
2.1 Situação actual	3
2.2 Efeito da salinidade nas plantas	4
3. Os citrinos e a salinidade	8
3.1 Toxicidade dos iões cloro e sódio	10
3.2 Homeostase iónica	13
3.3 Produção de osmólitos	15
3.4 Stresse oxidativo	17
3.5 Mecanismos de defesa celular	19
3.6 Peroxidação de lípidos	23
4. Utilização de silício na redução do stresse salino	26
II. Procedimento Experimental	30
<hr/>	
1. Descrição do ensaio <i>in vivo</i>	31
2. Descrição do ensaio <i>in vitro</i>	31
3. Descrição do ensaio <i>in vivo</i> com porta-enxertos	33
4. Determinação dos elementos minerais: silício, cloretos, sódio, potássio e cálcio	35
4.1 Determinação do teor em silício	35
4.2 Determinação do teor em cálcio, cloretos, potássio e sódio	36
5. Determinação do teor em prolina	37

6. Determinação do pH das folhas de citrinos	38
7. Determinação da actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo	38
7.1 Superóxido dismutase	39
7.2 Catalase	39
7.3 Ascorbato peroxidase	40
8. Determinação da peroxidação dos lípidos	40
9. Tratamento estatístico dos resultados	41
III. Resultados	42
<hr/>	
1. Ensaio <i>in vivo</i>	43
1.1 Elementos minerais: cloretos, sódio, potássio e cálcio	43
1.2 Actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo	47
1.2.1 Superóxido dismutase	48
1.2.2 Catalase	49
1.2.3 Ascorbato peroxidase	50
2. Ensaio <i>in vitro</i>	51
2.1 Elementos minerais: silício, cloretos, sódio, potássio e cálcio	51
2.2 Teor em prolina	55
2.3 Actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo	56
2.3.1 Superóxido dismutase	57
2.3.2 Catalase	57
2.3.3 Ascorbato peroxidase	58
2.4 Peroxidação de lípidos	59
3. Ensaio <i>in vivo</i> com porta-enxertos	60
3.1 Elementos minerais: silício, cloretos, sódio, potássio e cálcio	60
3.2 Teor em prolina	65
3.3 Actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo	66
3.3.1 Superóxido dismutase	66
3.3.2 Catalase	67
3.3.3 Ascorbato peroxidase	68
3.4 Peroxidação de lípidos	69

IV. Discussão dos Resultados	71
<hr/>	
V. Conclusões	87
<hr/>	
VI. Perspectivas Futuras	90
<hr/>	
VII. Referências Bibliográficas	92
<hr/>	
Anexo I – Constituição do fertilizante aplicado	111
Anexo II – Determinação do pH das folhas	113

Índice de Figuras

Figura 1 - Funções bioquímicas associadas à tolerância das plantas ao stresse salino. A esquematização da célula vegetal, inclui os três compartimentos que são definidos pela membrana plasmática e tonoplasto (<i>Adaptado de Bohmert e Jensen, 1996</i>).	5
Figura 2 - Estabelecimento da homeostase celular após adaptação ao sal (NaCl). Com indicação de osmólitos sintetizados, compartimentação de iões no citoplasma e vacúolo, e proteínas transportadoras responsáveis pela homeostase de Na ⁺ e Cl ⁻ (<i>Adaptado de Hasegawa et al., 2000</i>).	15
Figura 3 - Formação e sequestro do radical superóxido e da molécula de peróxido de hidrogénio, e indução da peroxidação de lípidos pelo radical hidróxilo com estabilização lipídica através da glutathione peroxidase. APX, Ascorbato peroxidase; ASC, Ascorbato; CAT, Catalase; DHA Dihidroascorbato; DHAR, dihidroascorbato redutase; Fd, Ferredoxina; FS I, Fotosistema I; GR, Glutathione redutase; GSH, Glutathione; GSSG, Oxi-glutathione; HO., radical hidróxilo; LH, Lípido; L., LOO., LOOH, radicais instáveis de lípidos e hidroperóxidos; LOH, lípido estável (ácido gordo); MDHA, Monodihidroascorbato; NE, reacção Não-Enzimática; PHGPX, Fosfolípido-hidroperóxido glutathione peroxidase; POD, Peroxidase; SOD, Superóxido dismutase (<i>Adaptado de Sairam e Tyagi, 2004</i>).	21
Figura 4 - Cultivares de citrinos no campo (CEAT): (a) ‘Valencia late’/C. Troyer B2, (b) ‘Nova’/C. Troyer B2.	32
Figura 5 – Ensaio com discos de folhas: (a) Corte dos discos de folhas com 10 mm diâmetro; (b) incubação dos discos de folhas, com iluminação e agitação.	33
Figura 6 - Esquema da sementeira na estufa: (a) Tangerineira Sunki; (b) Citranjeira Troyer B2.	34
Figura 7 - Acumulação de sódio intracelular em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, ‘Nova’/Citranjeira Carrizo; V/CC, ‘Valencia late’/Citranjeira Carrizo; (b) N/CM, ‘Nova’/C. <i>macrophylla</i> ; V/CM, ‘Valencia late’/C. <i>macrophylla</i>	44
Figura 8 - Acumulação de cloro intracelular em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, ‘Nova’/Citranjeira Carrizo; V/CC, ‘Valencia late’/Citranjeira Carrizo; (b) N/CM, ‘Nova’/C. <i>macrophylla</i> ; V/CM, ‘Valencia late’/C. <i>macrophylla</i>	45

- Figura 9** - Acumulação de potássio intracelular em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (b) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*.....45
- Figura 10** - Acumulação de cálcio intracelular em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (b) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*.....46
- Figura 11** - Variação da razão K^+/Na^+ em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova' x Citranjeira Carrizo; (b) V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (c) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; (d) V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*.....47
- Figura 12** - Actividade específica da SOD em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; (b) V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (c) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; (d) V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*. As barras correspondem ao erro padrão.....48
- Figura 13** - Actividade específica da CAT em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; (b) V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (c) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; (d) V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*. As barras correspondem ao erro padrão.....49
- Figura 14** - Actividade específica da APX em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; (b) V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (c) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; (d) V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*. As barras correspondem ao erro padrão.....50
- Figura 15** - Acumulação de silício em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício As barras verticais correspondem ao erro padrão.....51
- Figura 16** - Acumulação de cloretos em discos de folhas de cultivar de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão..52
- Figura 17** - Acumulação de sódio em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão..53

Figura 18 - Acumulação de potássio em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão..53	53
Figura 19 - Variação da razão K^+/Na^+ em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e Si. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.....54	54
Figura 20 - Acumulação de cálcio em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão..55	55
Figura 21 - Teor em prolina em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.56	56
Figura 22 - Actividade específica da SOD em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão..57	57
Figura 23 - Actividade específica da CAT em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão..58	58
Figura 24 - Actividade específica da APX em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão..59	59
Figura 25 - Concentração de malonaldeído em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.....60	60
Figura 26 - Acumulação de silício em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos a NaCl, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.....61	61
Figura 27 - Acumulação de cloretos em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.61	61
Figura 28 - Acumulação de sódio em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão....62	62

Figura 29 - Acumulação de potássio em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.	63
Figura 30 – Variação da razão K^+/Na^+ em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.	64
Figura 31 - Acumulação de cálcio em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão....	65
Figura 32 - Acumulação de prolina em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.	66
Figura 33 – Actividade específica da superóxido dismutase em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.	67
Figura 34 - Actividade específica da catalase em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.	68
Figura 35 - Actividade específica da ascorbato peroxidase em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.	69
Figura 36 – Acumulação de malonaldeído em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.	70

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Resposta bioquímica de porta-enxertos e cultivares de citrinos ao stresse salino.....	10
Tabela 2 – Modalidades aplicadas em discos de folhas de citrinos.	33
Tabela 3 - Modalidades aplicadas em porta-enxertos de citrinos.	34

I. Introdução

1. Enquadramento e objectivos do trabalho

Os citrinos são a cultura agrícola mais produzida em Portugal com cerca de 340 mil toneladas no ano de 2002, 75% das quais são produzidas na região do Algarve (INE, 2002). Geograficamente esta região está situada junto ao mar, pelo que a contaminação dos lençóis freáticos é um problema constante. Sendo esta a principal cultura agrícola da região, é de extrema importância o estudo dos efeitos da salinidade nestas plantas.

Neste trabalho, foi efectuado um estudo *in vivo* com porta-enxertos, a Citranjeira Troyer B2, por ser dos mais utilizados na região do Algarve, e a Tangerineira Sunki, por ser considerada resistente à salinidade.

Noutro ensaio, realizado na Universidade de Huelva, no âmbito do projecto SALCITRUS, estudou-se o comportamento *in vivo* de cultivares de citrinos, a ‘Valencia late’ e ‘Nova’, enxertadas em *Citrus macrophylla* e Citranjeira Carrizo.

Em paralelo, realizou-se outro estudo *in vitro*, utilizando discos de folhas de cultivares de citrinos, a ‘Valencia late’ e a ‘Nova’, enxertadas em Citranjeira Troyer B2.

Os objectivos principais deste trabalho, consistiram em estudar o efeito do NaCl ao nível do metabolismo celular, nomeadamente na:

- (1) acumulação dos iões tóxicos nas folhas de porta-enxertos e cultivares;
- (2) actividade de enzimas antioxidantes de stresse oxidativo;
- (3) produção de osmólitos (prolina);
- (4) verificação do efeito da salinidade ao nível dos lípidos de membrana (peroxidação de lípidos)

Nos ensaios com plântulas de porta-enxertos e discos de folhas de cultivares de citrinos foi ainda testado o efeito do silício (Si) na redução do stresse salino.

2. Salinidade

2.1 Situação actual

Numa altura em que o Mundo depende da agricultura para alimentar uma população sempre crescente, a quantidade de terra cultivável está a diminuir, em grande parte devido à salinidade dos solos (Alsup, 1998). De acordo com a FAO/Unesco (2000), cerca de 397 milhões de hectares de solo estão afectados pela salinidade, ou seja, 49,5% dos países participantes no estudo (cerca de 30 países pertencentes aos continentes Africano, Asiático, Americano, Oceania, Europeu). Dos 230 milhões de hectares regados, 19,5% estão afectados pela salinidade.

A salinidade dos solos, é considerada o factor ambiental mais limitante do crescimento e produtividade das plantas (Allakhverdiev *et al.*, 2000) uma vez que, quando sujeitas as estas condições, o transporte de nutrientes é deficiente (Nelsen, 1991). Embora o sódio (Na^+) e o cloro (Cl^-) sejam os elementos mais abundantes em solos salinos, também estão presentes outros sais solúveis como cloreto e sulfato de sódio, cálcio e magnésio (Abrol *et al.*, 1998).

Na região hidrográfica do Algarve, existem vários problemas de salinização que poderão, nalguns casos, ser provocados pela água do mar onde a concentração de Na^+ é cerca de 460 mM, e a de Cl^- cerca de 540 mM (Taiz e Zeiger, 2002). Em 1991, o teor mínimo de Cl^- na campina de Faro já era superior ao valor máximo admitido para consumo humano, e o teor máximo era de 28,84 mM Cl^- .

Os últimos dados disponíveis reportam a Março de 1994, e mostram um recuo inferior a 14,10 mM de Cl^- . É importante salientar, que os principais fenómenos modificadores na região, deverão ser a intrusão marinha nas captações mais próximas do litoral, como

consequência de um aumento do consumo de água doce, e a dissolução de rochas evaporíticas em captações mais distantes da linha da costa (Lobo-Ferreira *et al.*, 1995).

2.2 Efeito da salinidade nas plantas

São grandes os desafios que as plantas têm de ultrapassar, devido ao excesso de sal (NaCl) no solo e na água de rega. A acumulação dos iões Na^+ e Cl^- na zona da raiz, provoca stresse osmótico, a homeostase iónica celular é interrompida, induzindo à inibição do transporte intracelular de elementos essenciais como K^+ , Ca^{2+} , e NO_3^- e à acumulação de níveis tóxicos de Na^+ e Cl^- (Paranychianakis e Chartzoulakis, 2005). São três os potenciais efeitos da salinidade nas plantas: (1) a redução do potencial hídrico; (2) a toxicidade directa de Na^+ e/ou Cl^- absorvidos e; (3) a interferência na absorção de nutrientes essenciais (Flowers e Flowers, 2005).

Tendo em conta que o stresse salino envolve stresse osmótico e iónico (Hagemann e Erdmann, 1997; Hayashi e Murata, 1998), a supressão do crescimento está directamente relacionada com a concentração de sais solúveis ou com o potencial osmótico da água do solo (Flowers *et al.*, 1977; Greenway e Munns, 1980). Em plantas sensíveis à salinidade, a diminuição do crescimento ocorre poucas horas após contacto com o NaCl, e este efeito não está directamente relacionado com a concentração de Na^+ , mas sim com a resposta à osmolaridade da solução externa (Munns *et al.*, 2000, Munns, 2002).

As plantas desenvolveram uma panoplia de mecanismos moleculares e bioquímicos, para ultrapassar os efeitos do stresse salino. De entre os mecanismos bioquímicos, destacam-se:

- (1) a acumulação selectiva ou exclusão de iões;

- (2) o controlo da absorção de iões pelas raízes e transporte para as folhas;
- (3) a compartimentação dos iões ao nível das células e da planta;
- (4) a síntese de osmólitos (solutos compatíveis);
- (5) a alteração das vias fotossintética e respiratória;
- (6) a alteração da estrutura da membrana;
- (7) a indução da síntese de enzimas e compostos antioxidantes,
- (8) a indução da síntese de hormonas (Fig. 1) (Bohnert e Jensen, 1996).

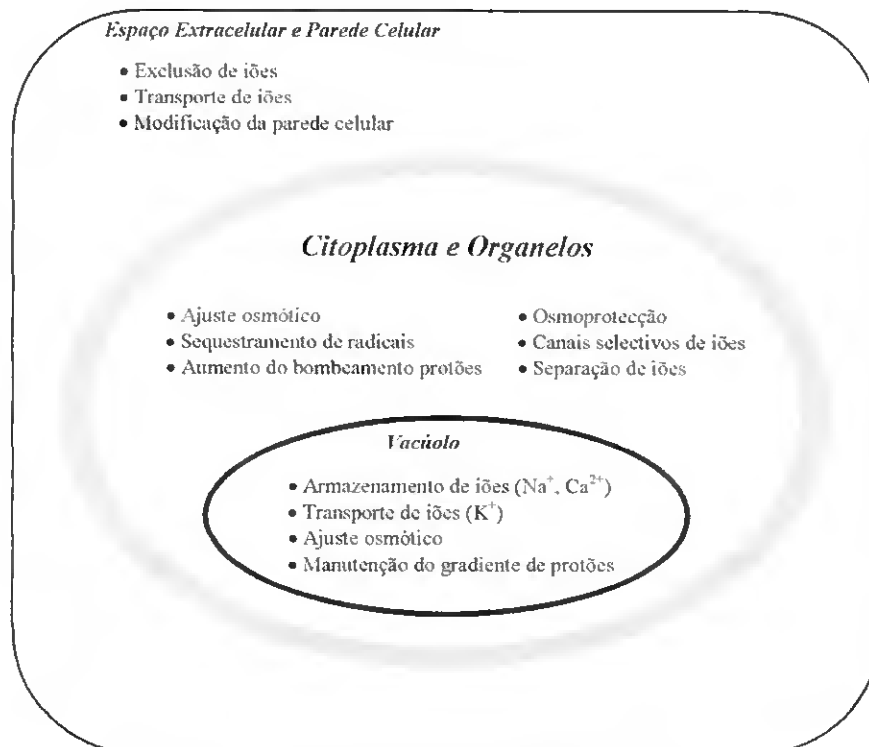


Figura 1 - Funções bioquímicas associadas à tolerância das plantas ao stress salino. A esquematização da célula vegetal, inclui os três compartimentos que são definidos pela membrana plasmática e tonoplasto (Adaptado de Bohnert e Jensen, 1996).

O ajuste osmótico que as células necessitam de fazer, envolve gastos de manutenção que estão relacionados com a síntese de solutos (como a prolina e betaina), transporte de íons e reparação da estrutura celular (Yeo, 1983; Stavarek e Rains, 1985), daí que o reestabelecimento osmótico, seja mais um factor associado à diminuição do crescimento das plantas (Van Volkenburgh e Boyer, 1985). Também foi proposto que uma parte da diminuição do crescimento, poderia estar associada à supressão da fotossíntese (Prior *et al.*, 1992; Munns, 2002).

Estudos realizados em várias espécies de plantas, indicaram que uma redução no valor da condutância do mesófilo, devido à salinidade, induz alterações anatómicas nas folhas e redução da fotossíntese em citrinos (*Citrus sp.*) (Romero-Aranda *et al.*, 1998), videiras (*Vitis vinifera*) (Gibberd *et al.*, 2003; Downton, 1977), e oliveiras (*Olea europea*) (Bongi e Loreto, 1989; Loreto *et al.*, 2003).

De acordo com a capacidade que as plantas têm de crescer em meios salinos, podem ser classificadas em dois grupos principais, glicófitas e halófitas. A grande maioria das plantas são glicófitas e não conseguem tolerar o stresse causado pela salinidade, geralmente, o crescimento diminui quando expostas a um nível de salinidade superior a cerca de 10 mM de NaCl (cerca de 1dS/m) (Orcutt e Nilsen, 2000). A elevada concentração de sal, diminui o potencial osmótico da solução do solo, criando stresse hídrico nas plantas. A elevada salinidade, também conduz à toxicidade iónica, uma vez que o Na⁺ não é imediatamente sequestrado nos vacúolos, como acontece com a grande maioria das halófitas (Sairam e Tyagi, 2004). Finalmente, a interacção entre o sal e os nutrientes minerais, pode conduzir a um desequilíbrio ou deficiência nutricional. Como consequência destes factores, o crescimento cessa e ocorrem danos moleculares que, em último caso, podem conduzir à morte celular (McCue e Hanson, 1990).

As plantas halófitas, toleram concentrações de sal superiores às glicófitas (sensivelmente acima de 50 mM de NaCl), antes que ocorra uma diminuição do seu crescimento (Orcutt e Nilsen, 2000). As halófitas, desenvolveram mecanismos que lhes permitem crescer naturalmente em ambientes salinos, sendo um desses mecanismos, a presença de glândulas específicas que regulam as concentrações intracelulares de Na^+ e Cl^- (Schachtman e Liu, 1999).

Algumas culturas agrícolas são tolerantes à salinidade, dependendo da capacidade que têm para crescer e completar o seu ciclo de vida num substrato que contém elevada concentração de sal solúvel (Parida e Das, 2005). A tolerância à salinidade, está relacionada com a sua morfologia, capacidade de compartimentar iões e solutos compatíveis, regulação da transpiração, controlo do movimento dos iões, características de membrana, tolerância a um reduzido valor da razão K^+/Na^+ no citoplasma, e com a presença ou ausência de glândulas salinas (Flowers e Flowers, 2005). A variabilidade genética observada, na tolerância a este tipo de stresse ambiental, está geralmente associada à capacidade de exclusão do Na^+ e à manutenção do transporte de K^+ (Storey e Walker, 1999).

O stresse salino tem influência em grandes processos, como a fotossíntese, síntese proteica e metabolismos energético e lipídico (Parida e Das, 2005), uma vez que além de causar stresse iónico e osmótico, também conduz a stresse oxidativo.

O stresse oxidativo, traduz-se num aumento da produção de Espécies Reactivas de Oxigénio (*ROS-Reactive Oxygen Species*) nas plantas, que conduzem à alteração de moléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (McKersie e Leshem, 1994; Alscher *et al.*, 1997; Imlay, 2003). Como consequência, os mecanismos de defesa celular são activados aumentando assim a resposta celular ao stresse salino (Serrano e Rodriguez, 2002). De entre os mecanismos de defesa, incluem-se a resposta enzimática

e não-enzimática (Arbona *et al.*, 2003). Um dos primeiros ROS a ser formado durante o stresse oxidativo, é o anião superóxido (O_2^-) que é dismutado pelo enzima superóxido dismutase (SOD), resultando na formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio molecular (O_2). O H_2O_2 é então dismutado pela acção da catalase (CAT) e outras classes de peroxidases. A ascorbato peroxidase (APX) e glutaciona peroxidase (GPX), estão distribuídas ao longo da célula e catalisam a redução do H_2O_2 a água, pela utilização de co-substratos (Azevedo Neto *et al.*, 2005), o ascorbato e a glutaciona, respectivamente.

3. Os citrinos e a salinidade

A salinização secundária, proveniente da água de rega é um problema crescente na agricultura, a somar à salinidade dos solos. As espécies de citrinos crescem preferencialmente, em zonas semi-áridas onde a rega tem de ser constante. Nestas áreas, o solo e a água contêm quantidades de NaCl que podem afectar a sua produtividade (Ruiz *et al.*, 1997). Este é um problema estudado a nível agronómico (Zekri, 1993; Ruiz *et al.*, 1997), bioquímico (Cerezo *et al.*, 1997) e molecular (Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Avsian-Kretchmer *et al.*, 1999).

Apesar das espécies de citrinos serem consideradas sensíveis à salinidade (Maas, 1990, 1993), estudos indicam que dependendo do porta-enxerto (Cerdá *et al.*, 1977; Walker e Douglas, 1983; Zekri e Parsons, 1992) ou cultivar (Lloyd *et al.*, 1989, 1990; Nieves *et al.*, 1991), existe uma variação na tolerância ao NaCl, que está geralmente associada à capacidade de excluir Cl^- e/ou Na^+ .

Apesar dos porta-enxertos excluírem Na^+ das folhas, fazem-no geralmente em menor quantidade quando comparado com os Cl^- (Storey e Walker, 1999). Maas (1993),

considerou o porta-enxerto Tangerineira Sunki como aquele que melhor excluía Cl^- , quando comparado com a Tangerineira Cleopatra, a toranjeira ou a limeira 'Rangpur'. O mesmo autor, também verificou que o porta-enxerto laranjeira azeda foi aquele que melhor excluiu Na^+ , seguida da Tangerineira Cleopatra, da citranjeira 'Rusk', do limoeiro rugoso e da limeira 'Rangpur'. Nos citrinos, pensa-se que a variabilidade genética de tolerância à salinidade, está associada à capacidade que muitos porta-enxertos têm para excluir Cl^- (Storey e Walker, 1999).

De uma maneira geral, a resposta dos citrinos à salinidade está relacionada com a absorção de iões no meio, que diminuem o potencial hídrico no tecido foliar e criam um potencial negativo na manutenção do fluxo da água ao longo do xilema (Bañuls e Primo-Millo, 1992; Gómez-Cadenas *et al.*, 1998), bem com a produção de osmólitos, como a prolina (PRO). Este mecanismo para evitar o défice de água, tem efeitos adversos na fisiologia das plantas, porque ocorre em simultâneo um aumento da concentração de iões tóxicos para o metabolismo das células (Walker *et al.*, 1982; Bañuls *et al.*, 1997; Romero-Aranda *et al.*, 1998).

Na tabela 1, está representada a resposta bioquímica de porta-enxertos e cultivares de citrinos submetidos a stresse salino, nomeadamente a acumulação de iões, a actividade de enzimas associados ao stresse oxidativo, a produção de osmólitos (prolina, proliletaina) bem como os efeitos da salinidade ao nível dos lípidos de membrana (MDA-malonaldeído).

Tabela 1 – Resposta bioquímica de porta-enxertos e cultivares de citrinos ao stresse salino.

Porta-enxertos/Variedades	Material biológico	Resposta à salinidade	Referência
Citrangeira Carrizo (porta-enxerto)	folhas	↑MDA, ↑SOD, ↑APX, ↓CAT, ↑PRO	Arbona <i>et al.</i> , 2003
<i>Citrus reshni</i> (porta-enxerto)	folhas	↑Cl, ↑Na, ↓K, ↓Ca ↑PRO, ↑glucose	Fernandez-Ballester <i>et al.</i> , 1998
<i>Citrus sinensis</i> (porta-enxerto)	cultura células	↑SOD	Gueta-Dahan <i>et al.</i> , 2003
<i>Citrus volkameriana</i> (porta-enxerto)	folhas raízes	↑SOD, ↑APX, ~ APX	Gueta-Dahan <i>et al.</i> , 1997
‘Valencia late’ (cultivar)	folhas	↑prolabetaina	Lloyd <i>et al.</i> , 1989
Tangerineira Cleopatra (porta-enxerto)	folhas	↓Cl	Moya <i>et al.</i> , 2003
Citrangeira Carrizo	folhas	↑Cl	Moya <i>et al.</i> , 2003
<i>Citrus reshni</i>	folhas raízes	↑Cl, ↑Na, ↑K, ↓Ca ↑Cl, ↑Na, ↓K, ↑Ca	Ruiz <i>et al.</i> , 1997
Citrangeira Carrizo	folhas raízes	↑Cl, ↑Na, ↓K, ↓Ca ↑Cl, ↑Na, ↓K, ↓Ca	Ruiz <i>et al.</i> , 1997
Citrangeira Carrizo	folhas raízes	↑Cl, ↑Na, ↑Ca, ~K ↑Cl, ↑Na, ↓Ca, ↓K	Zekri e Parsons, 1992

Legenda:

↓ diminuição intracelular; ↑ aumento intracelular

MDA – Malonaldeído; PRO – Prolina

3.1 Toxicidade dos iões cloro e sódio

A toxicidade de determinados iões depende da capacidade que os porta-enxertos de citrinos têm, para limitar o seu transporte para as folhas ou para a cultivar enxertada (Al-Yassin, 2004). Foi proposto por Gorham *et al.* (1985), que um dos efeitos negativos do stresse salino é um desequilíbrio nutricional e/ou a toxicidade iónica, o que pode corresponder a níveis elevados de Na⁺ e Cl⁻ tóxicos, e baixos níveis de K⁺ e Ca²⁺

(Flowers *et al.*, 1977; Greenway e Munns, 1980). Assim, para que as células consigam lidar com os efeitos iónicos adversos, provenientes da salinidade, têm de ter a capacidade de excluir ou sequestrar Na^+ e Cl^- . Simultaneamente, têm de ter a capacidade de manter níveis de K^+ e Ca^{2+} adequados às actividades metabólicas (Mansour *et al.*, 2003).

Quando existe um excesso de NaCl no meio extracelular, as raízes das plantas tendem a manter esses níveis relativamente constantes ao longo do tempo, exportando os iões Na^+ e Cl^- , para o solo ou enviando-os para a parte aérea da planta. O ião Na^+ é rapidamente transportado para a parte aérea, através do fluxo de transpiração no xilema, mas também pode ser enviado para as raízes através do floema (Tester e Davenport, 2003).

Nos tecidos da parte aérea da planta, as elevadas concentrações de Na^+ podem provocar uma série de problemas osmóticos e metabólicos. As folhas são mais susceptíveis à toxicidade pelo Na^+ , comparativamente às raízes, uma vez que este ião é acumulado primeiramente em elevada quantidade na parte aérea, e só então nas raízes (por recirculação) (Tester e Davenport, 2003).

A toxicidade metabólica do Na^+ resulta, entre outras causas, da sua capacidade para competir com os locais de ligação do K^+ , essenciais às funções celulares. Mais de 50 enzimas são activados pelo K^+ , e neste aspecto o Na^+ não o pode substituir (Bhandal e Malik, 1988). Por esta razão, um factor importante na manutenção da tolerância à salinidade, consiste em manter elevados níveis da razão K^+/Na^+ no citoplasma, sendo 1, o valor mínimo (valores intracelulares de K^+ entre 100-200 mM e de $\text{Na}^+ < 1$ mM) (Yeo, 1998). A manutenção do valor desta razão, depende essencialmente da actividade dos sistemas de transporte, localizados na membrana plasmática ou no tonoplasto (membrana que separa o citoplasma do vacúolo), onde estarão incluídas vias selectivas,

ao K^+ e ao Na^+ , e não selectivas ao Na^+ . Entre as etapas principais de manutenção da razão K^+/Na^+ no citoplasma, incluem-se:

- (1) *interface solo/raiz-simplasma*, onde as membranas das células da epiderme e do cortex, determinam qual o ião que entra para o simplasma e em que concentração;
- (2) *interface raiz/xilema*, ao nível das células do parênquima, em que ocorre um segundo nível de controlo para ajustar a translocação dos iões para a parte aérea da planta;
- (3) *compartimentação*, que pode ocorrer ao nível celular, no citoplasma e no vacúolo (Fig 1), ou ao nível dos tecidos, pela recirculação do Na^+ e K^+ entre as folhas novas e velhas (Maathuis e Amtmann, 1999).

Portanto, se as células não conseguirem manter os níveis de Na^+ baixos no citoplasma, ou elevados níveis da razão K^+/Na^+ , vários processos enzimáticos podem ser interrompidos, uma vez que a síntese de proteínas requer elevada concentração de K^+ (Blaha *et al.*, 2000; Tester e Davenport, 2003).

Geralmente o transporte do Na^+ é balanceado com o de Cl^- e o de K^+ . O transporte de aniões ao longo da membrana plasmática é normalmente efectuado por transporte activo, sendo necessário o co-transporte com protões (Gerson e Poole, 1972; Beilby e Walker, 1981; McClure *et al.*, 1990; Ruiz-Cristin e Briskin, 1991; Hawkesford *et al.*, 1993; Miller e Smith, 1996; Felle, 1994).

A principal fonte de Cl^- nos citrinos é, normalmente, a solução de solo onde este é absorvido pelas raízes sendo depois transportado ao longo do xilema, no fluxo da transpiração, para a parte aérea onde é acumulado nas folhas e frutos (Raveh, 2005).

Quando a concentração de Cl^- é elevada, é possível que o potencial de membrana seja menos negativo, que o potencial de equilíbrio do Cl^- , possibilitando o influxo passivo do anião (Skerrett e Tyerman, 1994). Sob condições normais, a concentração deste anião no citoplasma é de aproximadamente 20 mM (Felle, 1994; Grabov *et al.*, 1997). Alguns estudos indicam que sob condições salinas, pode ocorrer o influxo passivo de Cl^- para as células e para o xilema, na raiz (Cram, 1973; Kingsbury e Epstein, 1986; Binzel *et al.*, 1988).

Foi sugerido por White (1999), que o influxo de Na^+ é largamente inibido por iões divalentes. Sob condições de salinidade, as plantas aumentam a concentração de Ca^{2+} no citoplasma (Poovaiah e Reddy, 1993). Este catião, é indispensável à estabilidade das membranas e em processos de sinalização (Bressan *et al.*, 1998). O Ca^{2+} é particularmente importante na nutrição das plantas expostas a salinidade, porque a sua função consiste em reduzir o transporte de Na^+ aumentando o de K^+ , resultando num aumento do crescimento das plantas (Rengel, 1992).

3.2 Homeostase iónica

Num ambiente hipersalino, o resultado será a perturbação do estado de equilíbrio iónico devido não só, à presença de Na^+ e Cl^- , mas também de K^+ e Ca^{2+} (Niu *et al.*, 1995). A elevada concentração de NaCl, conduz à acumulação de Ca^{2+} no citoplasma, que aparentemente, sinaliza a resposta de stresse salino (Hasegawa *et al.*, 2000).

Os iões entram para as células, através de proteínas que constituem parte integrante da membrana celular. Estas proteínas podem formar canais, ao longo dos quais os iões se difundem a favor do gradiente electroquímico, onde a proteína se ligue ao ião de um lado da membrana, e o liberte do outro lado (transporte activo primário) (Fig. 2)

(Flowers e Flowers, 2005). O processo é conduzido por bombas iónicas com gastos de energia, armazenada sob a forma de ATP. O movimento dos protões ao longo da membrana, gera diferentes concentrações de iões H^+ (pH) e um potencial electroquímico. É a diferença de potencial, que permite a entrada dos catiões ao longo dos canais, e a diferença de concentração de iões H^+ , gera um gradiente de protões, conduzindo o movimento dos iões pelos transportadores (aos quais os protões e iões se ligam) (Flowers e Flowers, 2005).

Qualquer excesso de Na^+ no citoplasma ($[Na^+] > 1$), tem de ser excluído das células, sequestrado no vacúolo ou no apoplasma (Fig. 2) (Sairam e Tyagi, 2004). Apesar do conhecimento acerca da forma como o K^+ atravessa a membrana celular, pouco se sabe acerca da forma como o Na^+ entra para as células (Flowers e Flowers, 2005). São várias as hipóteses avançadas, para justificar a entrada de Na^+ relativamente à de K^+ , sob condições salinas. Uma das hipóteses avançadas, refere que este ião pode ser 'confundido' pelo K^+ , por parte do transportador de potássio, outra hipótese, é a de que pode existir uma competição pelos locais de transporte, à entrada de K^+ para o simplasma (Niu *et al.*, 1996; Amtmann e Sanders, 1999; Blumwald *et al.*, 2000). Por outro lado, também existe a possibilidade do Na^+ citosólico competir com os locais de ligação do K^+ , inibindo processos metabólicos fortemente dependentes do K^+ (Maathuis e Amtmann, 1999), nomeadamente na translocação de hidratos de carbono, na abertura e fecho dos estomas, no transporte membranar, como co-factor de vários enzimas ou ainda funcionar como agente osmótico (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996).

A compartimentação do Na^+ no vacúolo, resulta numa estratégia eficiente para evitar os seus efeitos tóxicos ao nível do citosol. Este transporte é mediado pelo antiporte Na^+/H^+ (Fig. 2), e conduzido pelo gradiente electroquímico de protões, formado pelos enzimas do vacúolo, como a H^+ -ATPase (Blumwald, 1987).

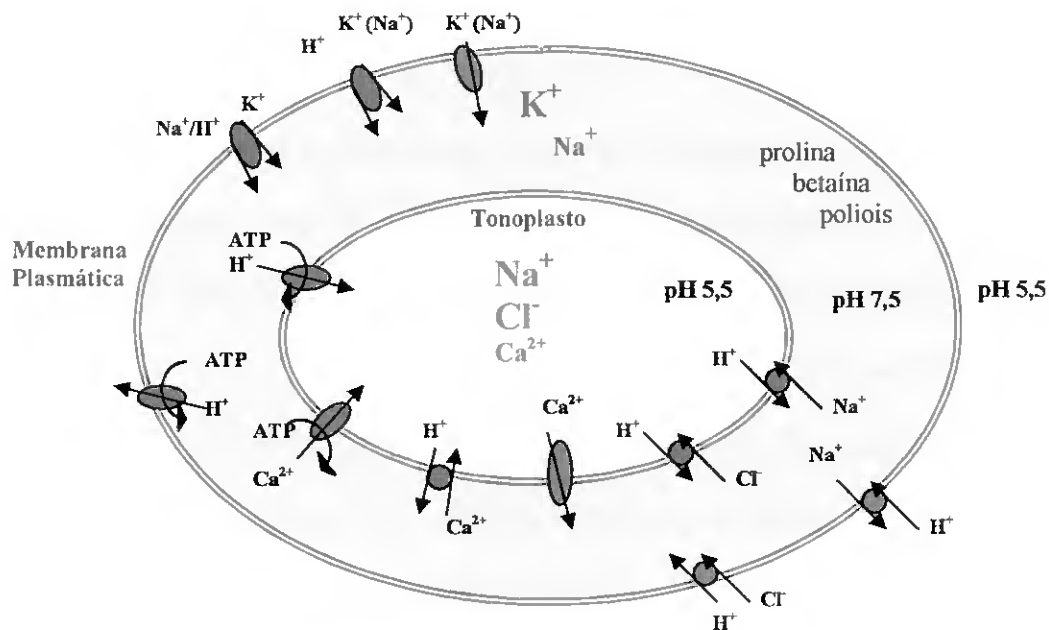


Figura 2 - Estabelecimento da homeostase celular após adaptação ao sal (NaCl). Com indicação de osmólitos sintetizados, compartimentação de íons no citoplasma e vacúolo, e proteínas transportadoras responsáveis pela homeostase de Na^+ e Cl^- (Adaptado de Hasegawa *et al.*, 2000).

3.3 Produção de osmólitos

Quando expostas a condições de stresse, muitas plantas tendem a acumular compostos osmoticamente activos, conhecidos por osmólitos (também denominados de solutos compatíveis) (Hare *et al.*, 1998). É a função osmoregulatória, que tipicamente lhes é atribuída uma vez que, geralmente são acumulados nas células como resposta ao stresse osmótico (Bohnert e Shen, 1999). Será a partir da síntese destes compostos no citoplasma, que muitas espécies de plantas conseguem manter o equilíbrio osmótico, uma vez que, a sua acumulação nas células baixa o potencial hídrico, ocorrendo uma maior entrada de água para o interior das células (Taylor, 1996). Estes osmólitos

produzidos, não alteram o metabolismo, possivelmente até o protegem, por isso também são denominados de solutos compatíveis (Pollard e Wyn, 1979; Rathinasabapathi, 2000).

Existem diferentes compostos com esta função, por exemplo, o potássio se disponível, pode funcionar como soluto compatível (Serrano, 1996) em organismos unicelulares, e uma concentração de potássio suficiente no solo, conduz a uma exclusão mais eficiente do sódio, em plantas superiores (Niu *et al.*, 1995). Também os açúcares, derivados de aminoácidos e aminoácidos, como betaina, glicina, manitol e prolina (PRO) (Kozłowski, 1997), bem como compostos de amónia quaternária, podem exercer funções osmoregulatórias nas plantas (Bohnert e Shen, 1999). Tipicamente, estes são compostos polares, com pouca carga e de elevada solubilidade. Estas moléculas, serão preferencialmente solubilizadas na célula em locais onde existe maior quantidade de água armazenada, a fim de poderem interagir directamente com macromoléculas, como as proteínas (Sairam e Tyagi, 2004), uma vez que, outra das funções destes solutos consiste na estabilização da estrutura e função de proteínas, complexos proteicos ou membranares, quando sujeitas a condições de stresse. Os solutos compatíveis, podem inclusive ajudar a ultrapassar os efeitos inibitórios da salinidade ao nível da actividade enzimática (Bohnert e Shen, 1999).

Existe uma forte correlação entre o aumento dos níveis de PRO nas células e a sua capacidade de sobrevivência, quer em relação ao défice de água como a elevadas concentrações de NaCl (Taylor, 1996). No entanto, como demonstrado por Briens e Larher (1982), nem sempre a acumulação de PRO constitui uma resposta específica à salinidade nas plantas halófitas, enquanto que nas glicófitas o metabolismo da PRO é constitutivo de plantas superiores.

A regulação da PRO em citrinos, é diferente das glicófitas. Sob condições de stresse salino, o aumento dos níveis de PRO é inferior a metade (Nieves *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1993), ou simplesmente não existe resposta (Syvertsen e Yelenosky, 1988; Lloyd *et al.*, 1989) indicando que não é um factor genótipo de diferença de resistência à salinidade nestas espécies (Storey e Walker, 1999).

A PRO além de funcionar como osmólito, pode ainda estar envolvida na protecção da estrutura celular contra danos oxidativos, através do aprisionamento de radicais livres, ou funcionar como reserva de carbono e azoto, depois de ultrapassadas as condições de stresse (Hare *et al.*, 1998).

3.4 Stresse oxidativo

O ajuste osmótico que as células fazem para superar o défice de água, provocado pelo stresse salino, tem influência numa série de actividades metabólicas. Como consequência, as plantas ficam sujeitas a stresse oxidativo (Parida e Das, 2005), que é caracterizado pelo aumento da concentração intracelular de espécies, reactivas e oxidáveis, que são frequentemente denominadas de ROS (Betteridge, 2000). Devido à elevada solubilidade, o oxigénio molecular difunde-se rapidamente para dentro e para fora das células ao longo da membrana celular (McKee e McKee, 2003). O oxigénio molecular, reage muito lentamente com determinadas moléculas, como o DNA, proteínas e membranas. No entanto, se for reduzido, é convertido em moléculas altamente reactivas, os ROS (Winyard *et al.*, 2005), que podem modificar lípidos (Girotti e Kriska, 2004), ácidos nucleicos (Martinez *et al.*, 2003), e proteínas (Davies, 2004). Estes ROS incluem o oxigénio molecular (O_2), oxigénio singlete (1O_2), o

peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e os radicais superóxido (O_2^-) e hidróxilo ($^{\cdot}\text{OH}$) (Sairam e Tyagi, 2004).

Quando o O_2 está envolvido numa reacção, tem de ser activado, ocorrendo a inversão do *spin* de um electrão de cada vez. Esta via univalente cria intermediários, sendo o primeiro o radical O_2^- . A activação do O_2 , pode ocorrer em diferentes compartimentos da célula (Elstner, 1991), onde o O_2 está presente, como a mitocôndria, cloroplasto, microsomas, glioxissomas, peroxissomas, apoplasto e citosol (Erturk, 1999).

O stresse oxidativo nos cloroplastos, surge de variadas formas e tem origem em vários locais, por exemplo, nas proteínas de ligação da clorofila na membrana dos tilacóides, ou na interacção entre a clorofila e o oxigénio molecular (Ledford e Niyogi, 2005).

Pensa-se que um dos factores que conduz ao stresse oxidativo, seja o fecho dos estomas nas folhas, como consequência da salinidade. O transporte de dióxido de carbono (CO_2) fica limitado e existe menor quantidade de NADPH (forma reduzida da nicotinamina adenina dinucleótido fosfato) disponível como aceitador de electrões, nos processos respiratório e fotossintético, alternativamente é o O_2 que actua como aceitador de electrões (resultando na formação do radical superóxido) (Hernandez *et al.*, 1995). Assim, sendo a concentração de O_2 elevada durante a fotossíntese, os cloroplastos são locais propensos à formação de ROS (Fig. 3) (Asada e Takahashi, 1987). Estudos indicam que estes compostos também são produzidos na mitocôndria, e que em ambos os organelos existem mecanismos de defesa (Fig. 3) (Mittler, 2002).

Em condições de crescimento normais, a produção de ROS nas células é baixa (cerca de $240 \mu\text{M s}^{-1}$ de O_2^- e $0,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2). No entanto, sob condições de stresse, a concentração de O_2^- pode atingir os $720 \mu\text{M s}^{-1}$ e a de H_2O_2 $15 \mu\text{M}$ (Polle, 2001).

Em muitos casos, a formação de ROS é geneticamente programada, sendo induzida durante a fase de desenvolvimento das plantas, por alterações ambientais, e tem efeitos

adversos nos metabolismos primário e secundário (Foyer e Noctor, 2005). As células das plantas produzem ROS, particularmente O_2^- e H_2O_2 , como mensageiros secundários durante o desenvolvimento e crescimento da planta (Schroeder, *et al.*, 2001a, 2001b; Foreman *et al.*, 2003). Níveis sub-letais, podem funcionar como moléculas sinalizadoras, conduzindo as células a activar os mecanismos de defesa contra o stresse oxidativo (Ledford e Niyogi, 2005). Para ultrapassar ou minimizar os efeitos a nível celular do stresse oxidativo, as plantas recorrem a moléculas antioxidantes de baixo peso molecular, como o ascorbato e a glutathiona, e a vários enzimas como a SOD, CAT, APX, ou glutathiona peroxidase (GPX), que funcionam como sequestradores de ROS (Apse e Blumwald, 2002).

3.5 Mecanismos de defesa celular

Os ROS são produzidos nas células, em condições de stresse ou não, a diferença reside no facto de neste último caso, a relação entre a formação e eliminação de ROS ser balanceada (Alscher *et al.*, 2002).

Os compostos responsáveis pela defesa celular, contra estas espécies potencialmente citotóxicas, denominam-se antioxidantes (McKee e McKee, 2003). Os antioxidantes intracelulares incluem, moléculas de baixo peso molecular de espécies oxidáveis, e enzimas que degradam supéroxido e hidroperóxidos. A função destes sistemas antioxidantes, consiste em inibir a reacção de uma determinada molécula com os radicais livres, ou inibir a sua reacção com estruturas biológicas (Chaudière e Ferrari-Iliou, 1999), e de uma maneira geral são eficientes, uma vez que se oxidam mais rapidamente que a molécula ou átomo que estão a proteger (McKee e McKee, 2003).

Os principais enzimas antioxidantes, incluem dismutases, como a SOD e a CAT, que não consomem co-factores, e peroxidases dependentes de selénio, como a APX (Chaudière e Ferrari-Iliou, 1999).

A SOD, pertence à família das metaloenzimas e é encontrada em vários compartimentos celulares, podendo conter cobre, zinco, ferro ou magnésio, como co-factor (Allen, 1995). Este enzima, é responsável pela reacção de dismutação do anião O_2^- (Fig. 3), dando origem a H_2O_2 e O_2 (Parida e Das, 2005). Destes produtos da reacção formados, destaca-se a elevada toxicidade do H_2O_2 .

A CAT é um enzima de elevado peso molecular, que destrói o H_2O_2 em elevada concentração, catalisando a dismutação dos dois electrões, em O_2 e H_2O (Schonbaum e Chance, 1976). Quando a concentração de H_2O_2 é baixa, a APX é o primeiro enzima a actuar sobre o H_2O_2 , uma vez que apesar da CAT também actuar sobre este composto, o facto se de encontrar nos peroxissomas e de ter baixa afinidade para o substrato, limita a sua capacidade de manter a concentração de H_2O_2 suficientemente baixa, a fim evitar danos nos cloroplastos (Allen, 1995). Neste caso, a CAT actua como peroxidase, utilizando para isso co-substractos como álcoois, incluindo ascorbato e fenóis (Chaudière e Ferrari-Iliou, 1999). Além dos peroxissomas, a CAT pode estar presente no citosol e mitocôndria (McKersie e Leshem, 1994).

A APX, está presente em plantas, cianobactérias e algas (Asada, 1992). Em plantas superiores já foram caracterizadas pelo menos três isoformas de APX, as que estão ligadas à membrana dos tilacóides, e as situadas no estoma e citosol. Este enzima, na ausência de ascorbato é muito lábil, uma vez que este composto funciona como dador de electrões (Chen e Asada, 1989; Miyake *et al.* 1991), sendo este o primeiro passo do ciclo de Halliwell-Asada (Fig. 3). As APX, que produzem monodihidroascorbato (Fig.

3), estão localizadas exclusivamente no apoplasto e iniciam a via de degradação do ascorbato (Pignocchi *et al.*, 2003; Pignocchi e Foyer, 2003; Green e Fry, 2005).

Na presença de certos iões metálicos (Fe^{2+} e Fe^{3+}) ou iões quelantes, o H_2O_2 formado pode converter-se em $\cdot\text{OH}$, altamente reactivo, através da reacção de Haber-Weiss, representada na Fig. 3.

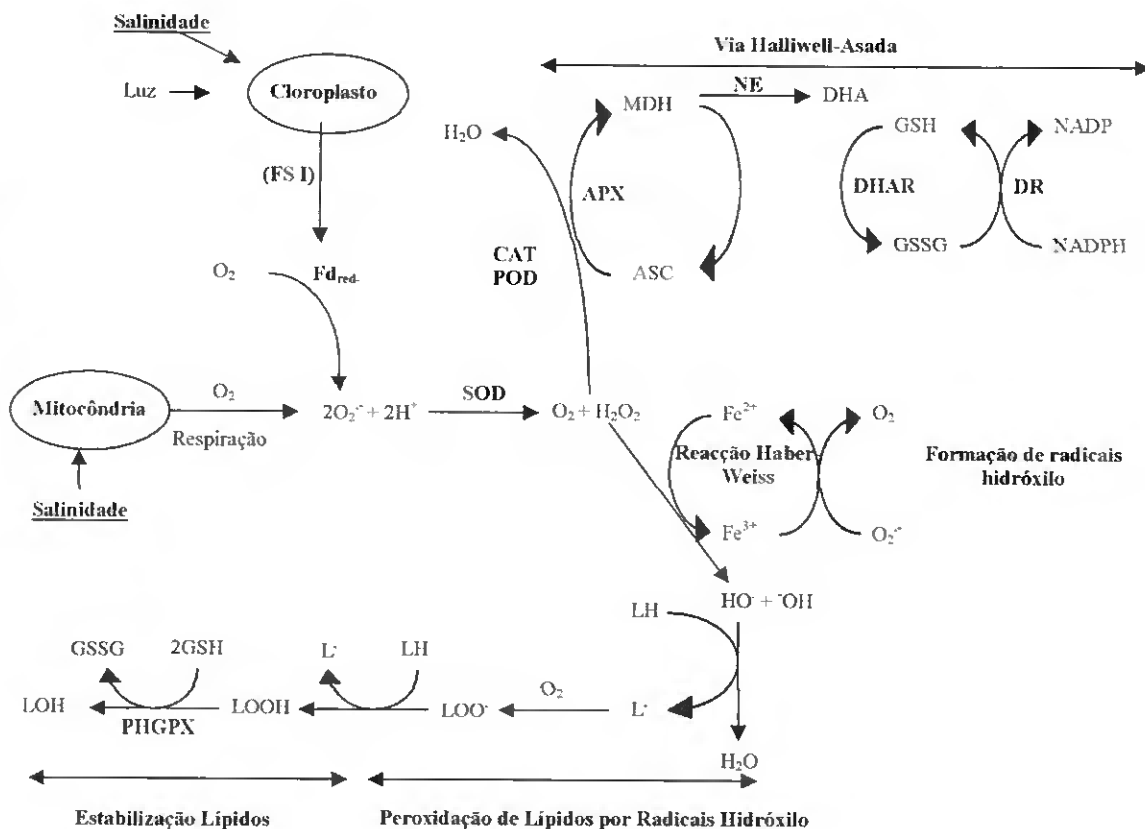


Figura 3 - Formação e sequestro do radical superóxido e da molécula de peróxido de hidrogénio, e indução da peroxidação de lipídios pelo radical hidróxilo com estabilização lipídica através da glutatona peroxidase. APX, Ascorbato peroxidase; ASC, Ascorbato; CAT, Catalase; DHA, Dihidroascorbato; DHAR, dihidroascorbato redutase; Fd, Ferredoxina; FS I, Fotosistema I; GR, Glutaciona redutase; GSH, Glutaciona; GSSG, Oxi-glutaciona; HO \cdot , radical hidróxilo; LH, Lípido; L \cdot , $\text{LOO}\cdot$, LOOH , radicais instáveis de lípidos e hidroperóxidos; LOH, lípido estável (ácido gordo); MDHA, Monodihidroascorbato; NE, reacção Não-Enzimática; PHGPX, Fosfolípido-hidroperóxido glutatona peroxidase; POD, Peroxidase; SOD, Superóxido dismutase (Adaptado de Sairam e Tyagi, 2004).

É muito importante que as células consigam manter o equilíbrio entre a actividade da SOD e APX ou CAT, a fim de manter os níveis de radicais O_2^- e H_2O_2 abaixo dos níveis tóxicos para a célula (Bowler *et al.*, 1991). Pensa-se que este equilíbrio, associado ao sequestro de íons metálicos é importante para evitar a formação de radicais $^{\cdot}OH$ altamente tóxicos (Asada e Takahashi, 1987).

Existem compostos antioxidantes de baixo peso molecular, como o α -tocoferol, o ascorbato, a glutathiona ou compostos fenólicos, que estão envolvidos na resposta não-enzimática ao stresse oxidativo.

O α -tocoferol (vitamina E) é o antioxidante mais eficiente dos radicais *peróxilo*, nas membranas biológicas (Chaudière e Ferrari-Iliou, 1999), estando por isso, localizado nas membranas dos tilacóides e plastídeos (Munné-Bosch, 2005). Em cooperação com outros antioxidantes, o α -tocoferol desempenha um papel importante na redução dos níveis de ROS (especialmente O_2 e $^{\cdot}OH$), tendo sido estimado que, uma molécula de α -tocoferol pode desactivar 120 moléculas de O_2 (Fahrenholz *et al.*, 1974).

Sob condições de stresse ambiental, as plantas geralmente respondem em duas fases: primeiro, com um aumento da síntese de α -tocoferol, segundo, com a diminuição da sua concentração (Munné-Bosch, 2005). Este aumento inicial (fase I), contribui para protecção, uma vez que reduz os níveis de ROS e inibe a peroxidação de lípidos, evitando o stresse oxidativo. Quando o stresse é muito severo, o tocoferol degradado excede os níveis sintetizados, e a sua concentração diminui (fase II) (Munné-Bosch, 2005).

Este composto tem a capacidade de reparar directamente radicais oxidáveis, evitando a fase de propagação durante a auto-oxidação de lípidos (Serbinova e Packer, 1994), reagindo com radicais *alcoxi* (LO^{\cdot}), *peróxilo* (LOO^{\cdot}) e *alquilo* (L^{\cdot}), derivados da oxidação dos lípidos (Buettner, 1993; Kamal-Eldin e Appelqvist, 1996).

O ascorbato (ASC) e a glutathiona (GSH), são os sequestradores de radicais livres mais importantes (Bendich *et al.*, 1986; Gérard-Monnier e Chaudière, 1996). O ASC é um dos antioxidantes mais fortes e mais bem estudado (Smirnoff, 1996; Noctor e Foyer, 1998; Arrigoni e De Tullio, 2000; Horemas *et al.*, 2000; Smirnoff, 2000). Sob condições fisiológicas, o ASC existe principalmente na sua forma reduzida, nas folhas e nos cloroplastos (Smirnoff, 2000), e a sua concentração é de aproximadamente 20 mM no citosol e de 20-300 mM no cloroplasto (Foyer e Lelandais, 1996). A sua capacidade de doar electrões em várias reacções enzimáticas e não-enzimáticas, tornam o ASC no principal desintoxicador de ROS na fase aquosa. O ASC pode sequestrar directamente os radicais O_2^- e $^{\cdot}OH$, o oxigénio singleto e reduzir o H_2O_2 a água, pela via de Halliwell-Asada (Fig. 3) (Noctor e Foyer, 1998).

O ASC tem ainda a função de regenerar o α -tocoferol, fornecendo protecção à membrana celular (Thomas *et al.*, 1992). A GSH, é um metabolito abundante nas plantas e tem muitas funções associadas (Noctor e Foyer, 1998). Este composto actua sobre o H_2O_2 , e reage não enzimaticamente com outros ROS, nomeadamente o 1O_2 , o O_2^- e o $^{\cdot}OH$ (Larson, 1988). A sua função principal na defesa antioxidante, está relacionada com a capacidade de regenerar o ASC, também pela via de Halliwell-Asada (Fig. 3) (Foyer e Halliwell, 1976; Noctor e Foyer, 1998).

3.6 Peroxidação de lípidos

Os lípidos são a reserva de energia mais eficiente, e são constituintes estruturais da maioria das membranas celulares (Singh *et al.*, 2002). Em todas as membranas celulares existe um movimento intenso de moléculas de dimensões reduzidas. No entanto, devido à natureza hidrofóbica do interior das membranas biológicas, a dupla camada lipídica

funciona como barreira extremamente impermeável à maioria das moléculas com carga eléctrica (Viegas e Cecílio, 1998). Será através desta selectividade, ao transporte de solutos para células, que é possível às proteínas transportadoras integrantes da membrana, operarem contra o movimento inverso dos iões (Tyerman e Skerrett, 1999). Sob condições de salinidade e devido essencialmente ao stresse oxidativo, a composição dos lípidos parece ser alterada em algumas plantas (Müller e Santarius, 1978; Mansour *et al.*, 1994) mas não noutras (Brown e DuPont, 1989).

São os ácidos gordos poli-insaturados (PUFA), principais componentes da membrana lipídica, os mais susceptíveis à peroxidação (Blokhina, 2000), como consequência dos radicais livres formados durante o stresse oxidativo.

A peroxidação de lípidos (PL) é um processo metabólico natural sob condições aeróbias normais, sendo um dos processos mais investigados como consequência da acção dos ROS na estrutura e função das membranas (Blokhina *et al.*, 2003). A PL é problemática, na medida em que os enzimas não controlam muitas das reacções oxidativas, e alguns dos compostos formados são altamente reactivos (p.e. aldeídos), modificando proteínas e ADN (Singh *et al.*, 2002).

São principalmente os esteróis, que modelam a permeabilidade da dupla camada da membrana aos iões (De Grier *et al.*, 1968; Benz e Cros, 1978), e são conhecidos por modular a actividade de transportadores de membrana, como a proteína responsável pelo bombeamento de protões (H^+), a H^+ -ATPase, (Cooke e Burden, 1990).

Douglas e Walker (1984), sugeriram que a modificação da actividade da ATPase em raízes de citrinos, poderia estar relacionada com uma alteração na proporção esteróis:fosfolípidos, o que consequentemente alteraria a fluidez da membrana e a conformação do enzima. Contudo, a modulação da actividade do enzima ATPase, pode resultar de alterações na ligação directa dos lípidos ao enzima (Simmonds *et al.*, 1982).

As alterações entre os componentes dos lípidos e as proteínas transportadoras na membrana, também foram consideradas em estudos com salinidade. De facto, modificações na composição dos lípidos podem ter elevados efeitos nos sistemas de transporte activo e passivo, e assim alterar a permeabilidade iónica da membrana (Neyses *et al.*, 1985; Yeagle, 1985; Carruthers e Melchior, 1986; Yeagle, 1991; Bhushan e McNamee, 1993; Chang *et al.*, 1995; Kaile, 1997). Quando as raízes de citrinos são expostas à salinidade, absorvem rapidamente o Na^+ e Cl^- presentes (Storey e Walker, 1987) no entanto, o transporte de Na^+ e Cl^- parece não ser efectuado somente por difusão passiva ao longo da matriz da membrana (Carruthers e Melchior, 1986).

O aumento da concentração de iões pode modular interacções, entre a camada lipídica e os péptidos que formam os canais iónicos, uma vez que com o aumento da concentração de NaCl (50-200 mM), a estrutura dos péptidos é alterada (Lee *et al.*, 1993)

São os átomos de hidrogénio, adjacentes às ligações duplas na cadeia dos PUFA (ácidos gordos poli-insaturados), os principais alvos de ataque dos ROS (Singh *et al.*, 2002).

Os hidroperóxidos lipídicos, formados como resultado da PL, podem afectar as propriedades da membrana, como por exemplo, tornar a camada interna mais hidrofílica (Frenkel, 1991). Este fenómeno é muito importante para a terminação da PL, uma vez que, aumenta a hidrofílicidade da membrana, favorecendo a regeneração do tocoferol pelo ascorbato (Blokhina *et al.*, 2003).

Resumidamente, a reacção de PL é iniciada após a extracção do átomo de hidrogénio do PUFA ($\text{LH} \rightarrow \text{L}^\bullet$) (Fig. 3). O radical *lipídio* (L^\bullet) reage com o $^1\text{O}_2$, para formar o radical peróxido (L-O-O^\bullet). A reacção com a cadeia do radical inicia-se quando o radical *peróxilo* extrai um átomo de hidrogénio de outra molécula de ácido gordo. A presença de um ião metálico transiente, como o Fe^{3+} inicia a reacção posterior (Blokhina, 2000).

São vários os compostos utilizados como indicadores da decomposição dos PUFA, destacam-se os hidroperóxidos e o malonaldeído (MDA) (Draper *et al.*, 1993; Yeo *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). A determinação dos níveis de malonaldeído ou das espécies reactivas ao ácido tiobarbiturico (TBARS), são indicadores da peroxidação dos lípidos das membranas biológicas. Estudos indicam que os níveis de MDA ou TBARS aumentam, quando as plantas são sujeitas a condições de stresse salino (Wu *et al.*, 1998; Kerkeb *et al.*, 2001; Bor *et al.*, 2003; Vaidyanathan *et al.*, 2003), incluindo nos citrinos (Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Arbona *et al.*, 2003).

4. Utilização de silício na redução do stresse salino

O silício (Si) está presente nas plantas, em quantidade equivalente à de outros macronutrientes como o cálcio, o magnésio ou o fósforo, podendo variar entre 0,1 e 10% (peso seco) (Epstein, 1999). A bioquímica do silício e a forma como actua ao nível das células e com os seus constituintes ainda é desconhecida, por isso não é considerado um elemento essencial em plantas superiores.

Têm sido efectuados estudos, que visam esclarecer quais os processos bioquímicos em que está associado, especialmente na redução a factores de stresse biótico e abiótico.

De entre as funções atribuídas ao Si destacam-se :

- (1) o suporte para a parede celular;
- (2) protecção contra patogénicos;
- (3) a redução da perda de água por evapotranspiração;
- (4) a redução da toxicidade de determinados iões metálicos e,
- (5) no desenvolvimento de determinadas espécies de plantas (Savant *et al.*, 1999).

Existem indícios, que o transporte de Si difere entre espécies de plantas. Os legumes e outras dicotiledónias (ex: citrinos, feijão), possuem maior concentração deste ião, comparativamente às plantas monocotiledónias (ex: arroz, cevada) (Savant *et al.*, 1999). O processo de absorção e de transporte de Si nas plantas, está relacionado com a sua concentração no meio. Geralmente o silício está presente na forma não carregada de ácido silícico (H_4SiO_4), na gama de pH fisiológico (Savant *et al.*, 1999). Como esta molécula não é muito móvel na planta, após absorção pelas raízes, o transporte para a parte aérea é efectuado através do fluxo de transpiração ao longo do xilema, seguindo o movimento da água (Jones e Handreck, 1965). Desta forma, pensa-se que a transpiração favorece a translocação de Si, que é muitas vezes acumulado na fase terminal do fluxo de transpiração (Sangster e Hodson, 1992), geralmente junto aos estomas, na extremidade das folhas ou noutros locais onde a transpiração é intensa (Sangster e Hodson, 1992). Uma vez depositado, o Si fica imobilizado (Raven, 1983; Hodson e Sangster, 1990) no lúmen das células, na parede celular, no espaço intercelular ou nas camadas externas (Marschner *et al.*, 1990) e ainda localizar-se nas raízes ou folhas (Epstein, 1994). Gong e colaboradores (2005), observaram que as folhas da planta do trigo, tratadas com Si, apresentavam-se mais espessas que as folhas não tratadas. Por isso, o Si pode afectar a estabilidade das plantas pela deposição inerte na parede celular e, em plantas superiores, modular a biossíntese da leninha (Marschner, 1995).

Dependendo da capacidade de efectuar o transporte de Si, as plantas podem dividir-se em três grupos principais (expresso em % de peso seco): (1) entre 10-15% Si (p.e. arroz); (2) entre 1-3% Si (p.e. cana-de-açúcar e a maioria dos cereais); (3) < 0,5% Si (maioria das dicotiledóneas) (Marschner, 1995). Num conjunto de 175 plantas que cresceram no mesmo solo, Takahashi e Miyake (1977), diferenciaram plantas

acumuladoras de Si (o transporte de Si é superior ao da água) e plantas não acumuladoras de Si (o transporte de Si é igual ou inferior ao da água).

Devido ao facto do Si se encontrar preferencialmente na parede celular, existem evidências de que possa estar associado aos seus componentes, como polissacarídeos (Boylston *et al.*, 1990) e proteínas (Epstein, 1999). Existem proteínas (silicateínas) nas diatomácias (algas marinhas), responsáveis pelo transporte do ácido ortosilícico (Epstein, 1999), e pensa-se que estas proteínas também podem estar presentes em plantas (Kauss *et al.*, 2003).

Um estudo efectuado, demonstrou que a absorção de Si pelo xilema, é mediada por transportadores na planta do arroz, mas por difusão facilitada nas plantas do pepino e tomate (Mitani e Ma, 2005).

Estudos demonstraram que o Si desempenha funções importantes na tolerância das plantas a factores de stresse bióticos e abióticos (Epstein, 1999; Savant *et al.*, 1999). Matoh e colaboradores (1986), observaram que uma concentração de 0,89 mM de Si na solução de cultura do arroz, reduziu a translocação de Na^+ para o caule e aumentou o rendimento em peso seco, nas plantas stressadas com NaCl, quando comparadas com o controlo. Foi ainda demonstrado que a adição de Si, diminuiu a permeabilidade da membrana plasmática nas células das folhas (Liang, 1999; Liang *et al.*, 1996), e melhorou a estrutura dos cloroplastos, bastante danificados pela adição de NaCl (Liang, 1998). Além disso, está também demonstrado que o Si aumenta a actividade específica de enzimas de stress oxidativo, como a SOD, e suprime a peroxidação de lípidos induzida pelo NaCl, sugerindo que o Si afecta a estrutura, integridade e função da membrana plasmática (Liang, 1999; Liang *et al.*, 1996).

Relativamente às espécies de citrinos, Wutscher (1989) comparou o crescimento de uma cultura de laranjeiras, *Citrus sinensis*, em solução contendo 2,4 mM de Si, com outra

cultura onde o elemento não foi adicionado. Os resultados indicaram “uma função limitada deste elemento na nutrição dos citrinos”.

Estudos recentes, especialmente em espécies acumuladoras de Si, como as plantas da cevada (Liang, 1999; Liang *et al.*, 2003), do arroz (Yeo *et al.*, 1999), do tomate (Al-aghaby *et al.*, 2004) e do pepino (Zhu *et al.*, 2004), indicaram que a presença de Si estava directamente relacionado com o aumento da tolerância a condições adversas do meio, entre elas, a salinidade.

Iwasaki e colaboradores (2002), sugeriram um “aumento da tolerância ao magnésio”, no feijoeiro, tratado com Si. Ainda que neste estudo não tenha sido utilizado o NaCl, é de salientar que na realidade existem plantas dicotiledóneas capazes de responder à presença de Si, na redução a factores de stresse abiótico, como pode ser o caso das espécies de citrinos.

II. Procedimento Experimental

1. Descrição do ensaio *in vivo*

O ensaio com as cultivares de citrinos envasadas, foi realizado na Universidade de Huelva (Espanha). As árvores com um ano de idade, foram adquiridas num viveiro local, tendo sido utilizadas no ensaio a combinação de duas cultivares em dois porta-enxerto diferentes: as cultivares ‘Valencia late’ (*C. sinensis*) e ‘Nova’ (Tangerineira clementina fina x Tangelo orlando) nos porta-enxertos Citranjeira Carrizo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) e *Citrus macrophylla*. As árvores foram plantadas numa mistura de areia e turfa (4:1), e após o período de adaptação, procedeu-se à aplicação dos tratamentos salinos, num total de 120 árvores (10 por cultivar e tratamento).

Nos tratamentos salinos (NaCl) foram utilizadas as soluções com valores de condutividade eléctrica de 1, 3 e 6 dS/m. A rega foi controlada por um contador (AGRONOMIC 2000), com quatro injeções reguláveis (para o cálcio, azoto:fósforo:potássio e micronutrientes, e duas para o NaCl) (Anexo I). A rega foi efectuada a cada 8 a 10 dias, com a duração de 25 minutos (até drenagem da água de rega).

O estudo teve a duração de quatro meses, sendo que, a cada mês foram efectuadas colheitas para a análise mineral (realizada pelo Laboratório Agriquem-Agroalimentaria e Medio Ambiente, Sevilha, Espanha), e para análise enzimática foram efectuadas colheitas das folhas da 2ª rebentação no tempo 0 e ao fim de 3 meses.

2. Descrição do ensaio *in vitro*

Os discos de folhas de citrinos utilizados neste estudo, foram obtidos a partir de cultivares localizadas no CEAT (Fig. 4). As cultivares utilizadas foram a ‘Nova’

(Tangerineira clementina fina x Tangelo orlando) e a 'Valencia late' (*C. sinensis*), enxertadas no porta-enxerto Citranjeira Troyer B2 (híbrido da Washington Navel (*Citrus sinensis* L. Osbeck) x *Poncirus trifoliata* L. Raf.). As folhas seleccionadas foram as da última rebentação, sem sintomas de carências nutritivas nem defeitos provocados por pragas e doença.



Figura 4 - Cultivares de citrinos no campo (CEAT): (a) 'Valencia late'/C. Troyer B2, (b) 'Nova'/C. Troyer B2.

O método seguido para este ensaio, com discos de folhas, foi o proposto por Larher e colaboradores (2003), com algumas modificações. Depois de efectuada a colheita, as folhas foram transportadas numa geleira, para o laboratório onde foram imediatamente passadas por uma solução esterilizadora de NaOCl (Ridel-De Haën, Seelze, Germany) a 1% e várias vezes por água destilada. Por cada modalidade foram utilizados 30 discos de folhas (10 mm de diâmetro), que foram cortados com um fura-rolhas esterilizado, e transferidos para um copo contendo 30 ml de solução de referência (1 disco por ml), constituída por tampão MES (Sigma, Steinheim, Germany) 50 mM, pH 6,0, KCl (Ridel-De Haën) 1,5 mM e CaCl₂ (Ridel-De Haën) 10 mM (Fig. 5a). Procedeu-se da mesma forma para os restantes ensaios, colocando os discos na solução de referência contendo NaCl 68,12 mM (6 dS/m) e/ou Si 2,5 mM de acordo com a tabela 2. A incubação foi

feita durante 24 horas, à temperatura de 26 °C, com agitação e iluminação de 15 W/cm² (Fig. 5b). Foram efectuadas três réplicas por modalidade.

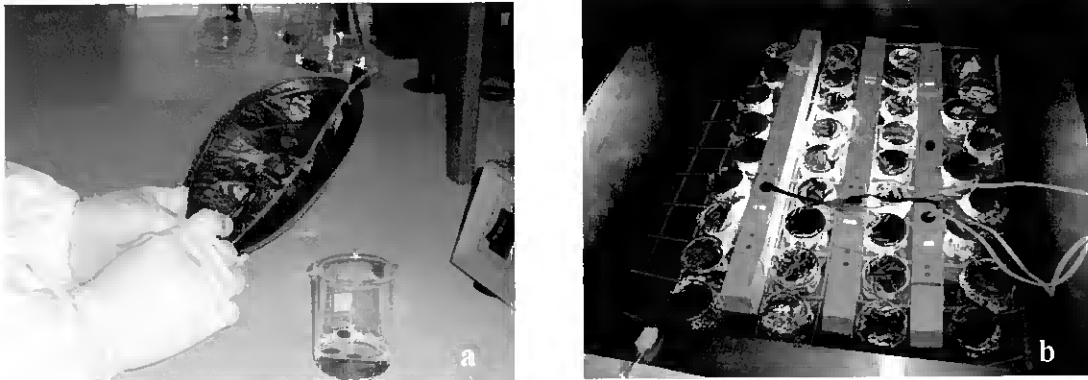


Figura 5 – Ensaio com discos de folhas: (a) Corte dos discos de folhas com 10 mm diâmetro; (b) incubação dos discos de folhas, com iluminação e agitação.

Findo o tempo de incubação o discos foram recuperados e macerados em azoto líquido, com um almofariz e pilão previamente gelados. O material vegetal macerado foi guardado, até posterior análise, à temperatura de -80 °C.

Tabela 2 – Modalidades aplicadas em discos de folhas de citrinos.

<i>Cultivares</i>	<i>Modalidades</i>
'Nova'/Troyer B2 e 'Valencialate'/Troyer B2	Controlo (CE = 0,81 dS/m)
	2,5 mM Si
	6 dS/m
	6 dS/m + 2,5 mM Si

3. Descrição do ensaio *in vivo* com porta-enxertos

As sementes dos porta-enxertos de Citranjeira Troyer B2 (híbrido da Washington Navel (*Citrus sinensis* L. Osbeck) x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) e Tangerineira Sunki (*Citrus sunki* Hort. Ex Tan.), foram obtidas no Campo de Experimentação Agrária de Tavira (CEAT). Para a sementeira utilizou-se uma mistura de turfa (Shamorok):vermiculita

(50:50). Após 3 meses, as plântulas foram transplantadas para vasos de 40 cm³, contendo a mesma mistura de substrato, suplementada com adubo sólido osmocote (2,5 g/l). Após 15 dias de adaptação, procedeu-se à aplicação de salinidade e/ou silício, ao longo de 28 dias (Fig. 6). Por cada modalidade foram utilizadas 30 plântulas.



Figura 6 - Esquema da sementeira na estufa: (a) Tangerineira Sunki; (b) Citranjeira Troyer B2.

As plântulas foram regadas duas vezes por semana, com 100 ml de uma solução contendo NaCl (J.M.G.Santos, Odivelas, Portugal), nas concentrações de 38,12 mM (3 dS m⁻¹) e 68,12 mM (6 dS/m), e/ou 2,5 mM de silício (Si) sob a forma de silicato de potássio (PQ Corporation, Valley Forge, USA) (Tabela 3).

A colheita das folhas para análise (totalidade das folhas de 6 plântulas), foi efectuada no tempo 0 e após 7, 14 e 28 dias de tratamento.

Tabela 3 - Modalidades aplicadas em porta-enxertos de citrinos.

<i>Porta-enxertos</i>	<i>Modalidades</i>
Sunki e Troyer B2	Água (CE= 0,81 dS/m)
	2,5 mM Si
	3 dS/m
	3 dS/m + 2,5 mM Si
	6 dS/m
	6 dS/m + 2,5 mM Si

Durante o tempo de estudo, as temperaturas máxima e mínima na estufa foram registadas, situando-se entre 32 e 41 °C, e entre 13 e 28 °C, respectivamente.

4. Determinação dos elementos minerais: silício, cloretos, sódio, potássio e cálcio

É importante referir, que o perfil mineral das folhas de cultivares de citrinos envasadas, (ensaio realizado na Universidade de Huelva), foi obtido pelo Laboratório Agriquem (Agroalimentaria e Medio Ambiente). Os métodos abaixo descritos, são referentes à análise mineral efectuada às folhas de plântulas de porta-enxertos e discos de folhas de cultivares de citrinos.

4.1 Determinação do teor em silício

A extracção de silício (Si) das amostras foi efectuada utilizando 25 mg de tecido vegetal aos quais se adicionou 1500 µl de água desmineralizada. De seguida, procedeu-se à incubação a 100 °C durante 30 minutos, com posterior arrefecimento das amostras. Para a determinação de silício (Si) seguiu-se o método proposto por Raggi e colaboradores (1999), com algumas modificações. A 500 µl de extracto, adicionou-se 500 µl da solução de reagente (preparado imediatamente antes), constituída por HClO₄ (Ridel-De Haën) a 35%, molibdato de amónio (Merck, Darmstadt, Germany) a 4,8%, ácido ascórbico (Ridel-De Haën) a 1%, e água ultra-pura (Millipore, Billerica, USA), na proporção de 1,6:1:1:6,4 (v/v/v/v). À mistura adicionou-se 250 µl de água ultra-pura. As amostras foram termoestabilizadas a 70 °C, durante 45 minutos, e após arrefecimento a absorvência foi registada. O comprimento de onda utilizado foi 830 nm, uma vez que a

reação do ácido salicílico com o molibdato de amónio ($[\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}]^{-4}$), e subsequente redução em meio ácido, forma um complexo azul estável ($[\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}]^{-5}$) (cujo máximo de absorção é a 830 nm). A curva padrão foi construída utilizando silicato de potássio (PQ Corporation), nas concentrações de 5, 10, 200 e 300 ng de Si/ml. O resultado foi expresso em nmol de Si/g de peso fresco.

4.2 Determinação do teor em cálcio, cloretos, potássio e sódio

A preparação das soluções de minerais para análise de cálcio, cloretos, potássio e sódio foi efectuada de acordo com o método de Bañuls e Primo-Millo (1995), com algumas modificações. O material vegetal macerado (50 mg) foi desidratado numa estufa a 60 °C, durante 72 h. O peso seco foi registado numa balança analítica (Precisa 205 A, Suíça), procedendo-se posteriormente à digestão ácida das amostras. Para tal, adicionou-se 2 ml de HNO_3 (Panreac, Barcelona, Espanha) a 65% e incubou-se durante 4 horas a 70 °C. Findo o tempo de incubação e após arrefecimento, adicionou-se 4 ml de água desmineralizada. De seguida, as soluções de amostra foram filtradas lentamente (Schleicher & Schuell, 1507), para balões volumétricos de 100 ml, sendo o volume completado com água desmineralizada.

A determinação de cálcio (Ca^{2+}) foi efectuada por espectrofotometria de absorção atómica (Shimadzu) utilizando-se soluções de Ca^{2+} (Merck) de concentração 0, 2, 4, 6, 8 ppm (partes por milhão), para a construção da curva padrão.

A determinação de potássio (K^+) e sódio (Na^+), foi efectuada por espectrofotometria de emissão atómica (Shimadzu). A curva padrão para o ião Na^+ (Merck) foi elaborada utilizando soluções de concentração 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ppm. Na determinação de potássio utilizaram-se soluções padrão de concentrações 0, 2, 4, 6 e 8 ppm.

A concentração de cloretos (Cl⁻) nas amostras foi determinada por potenciometria (pH Metter GLP 21, Crison, Barcelona, Espanha), utilizando-se um eléctrodo selectivo de cloretos (Mettler Toledo, Undorf, Suíça). Na análise de Cl⁻, adicionou-se às várias soluções de minerais, na proporção de 2:100 (V/V), solução ISA constituída por NaNO₃ (Ridel-De Haën) 5 M, para estabelecimento do equilíbrio electroquímico. A curva padrão foi elaborada com soluções de NaCl, de concentração 0,02, 0,1, 0,5, 10 e 50 mM.

5. Determinação do teor em prolina

A preparação do extracto para análise, foi efectuada de acordo com o método proposto por Aziz e colaboradores (1999), com algumas alterações. A 25 mg de tecido vegetal, adicionou-se 1500 µl de água desmineralizada, e incubou-se durante 30 minutos a 100°C. Findo o tempo, o extracto foi arrefecido num banho de água e gelo. Procedeu-se à centrifugação (Eppendorf 5415 D, Hamburg, Germany) a 10 000 rpm, durante 5 minutos. A prolina no extracto foi extraída de acordo com o método da ninidrina (Bates *et al.*, 1973). A 100 µl de extracto, adicionou-se 400 µl de reagente de ninidrina, constituído por ninidrina (Ridel-De Haën) a 1% (p/v) em ácido acético glacial (Ridel-De Haën). A mistura foi incubada a 95 °C, durante 1 hora, e os extractos arrefecidos num banho de água e gelo. O cromóforo formado foi extraído com 1 ml de tolueno por agitação vigorosa, durante 20 s. A absorvência da fase orgânica foi lida num espectrofotómetro (Ultrospect 2100 pro, Amersham Pharmacia, Cambridge, England) utilizando um comprimento de onda de 520 nm. A curva padrão foi construída com L-prolina (Ridel-De Haën), utilizando soluções de concentração 5, 10, 25, 50 e 75 nM. O resultado foi expresso em µmol de prolina/g de peso fresco.

6. Determinação do pH das folhas de citrinos

O valor de pH das folhas de citrinos foi determinado de acordo com o método referido nos *Health Canada Official Methods* (T-310, 1999). Pesou-se e macerou-se 1 g de folhas num almofariz, aos quais se adicionou 10 ml de água ultra-pura (Millipore). De seguida, procedeu-se à agitação mecânica a uma velocidade de 250 rpm (Echmund Bühler KL2, Tübingen, Germany), durante 30 min. As amostras foram colocadas no escuro durante 1 h, o sobrenadante foi decantado e utilizado na leitura do valor de pH num potenciómetro (pH Mitter 2002, Crison, Barcelona, Espanha). Depois de determinado o valor de pH (Anexo II), procedeu-se à preparação do tampão de extracção dos enzimas.

7. Determinação da actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo

Para a extracção dos enzimas do tecido vegetal, pesou-se 25 mg de tecido fresco macerado e adicionou-se 500 µl de tampão de extracção, constituído por tampão fosfato potássio, 50 mM, pH 6,3, Triton X-100 (Sigma) a 0.2%, EDTA (Ridel-De Haën) 0,1 mM e PVP (Sigma) 1% (w/v). Os extractos foram centrifugados (Beckman J2-MC, USA) a 15 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para verificar a actividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). A proteína solúvel no extracto foi determinada pelo método de Bradford (1976) modificado, através de um *kit* de determinação de proteínas da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, USA), utilizando Albumina Sérica Bovina (Merck) como padrão.

7.1 Superóxido dismutase

A actividade específica da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com o método proposto por Beyer e Fridovich (1987), com algumas modificações. O meio reactivo foi constituído por 918 μ l tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 (contendo EDTA 0,1 mM e Triton X-100 a 1% (v/v)), 50 μ l L-metionina (Merck) 13 mM, 100 μ l NBT (Sigma) 1,5 mM e 500 μ l riboflavina (Sigma) 0,12 mM. A reacção foi iniciada pela adição de 20 μ l de extracto enzimático e pela fotoiluminação da mistura reactiva, utilizando uma lâmpada de fluorescência de 15 W/cm². A reacção decorreu a uma temperatura de 25 °C, durante 7 minutos. Uma unidade enzimática (1 U) foi definida como a quantidade de SOD necessária para inibir a fotoredução do NBT em 50%, através da leitura da absorvência, de minuto a minuto, a um comprimento de onda de 560 nm (Ultrospect 2100 pro).

7.2 Catalase

A determinação da actividade específica da CAT (EC 1.11.1.6), foi baseada no método proposto por Chance e Maehly (1955). O meio reactivo foi constituído por 870 μ l de tampão fosfato potássio 50 mM, pH 6,8, 60 μ l de H₂O₂ (Merck) 60 mM a 30%. A reacção foi iniciada pela adição de 30 μ l de extracto enzimático. A leitura da absorvência foi efectuada de 10 em 10 s, durante 180 s, a um comprimento de onda de 240 nm (Ultrospect 2100 pro). A actividade foi determinada por medição da velocidade inicial de desaparecimento de H₂O₂. O resultado foi expresso em U/mg de proteína, considerando o coeficiente de extinção molar (ϵ) do H₂O₂ como sendo 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹.

7.3 Ascorbato peroxidase

Para determinar a actividade específica da APX (EC 1.11.1.11), seguiu-se o método proposto por Nakano e Asada (1981), com algumas modificações. A mistura reactiva foi constituída por 875 μl de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 (contendo EDTA 0.1 mM), 25 μl de H_2O_2 2 mM a 30%, 50 μl de L-ascorbato (Sigma) 0,5 mM. A reacção foi iniciada pela adição de 25 μl de extracto enzimático. A oxidação do ascorbato, dependente de H_2O_2 , foi seguida de 10 em 10 s, durante 180 s, a um comprimento de onda de 290 nm (Ultrospect 2100 pro). A actividade foi determinada por medição da velocidade inicial de consumo do ascorbato, considerando o coeficiente de extinção molar (ϵ) do L-ascorbato de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em U/mg de proteína.

8. Determinação da peroxidação dos lípidos

A extracção de lípidos foi baseada no método proposto por Hodges e colaboradores (1999). As amostras de tecido vegetal (25 mg) foram homogeneizadas num almofariz, em 1500 μl de etanol a 80%. O extracto foi centrifugado (Eppendorf, 5415 D) a 10 000 rpm, durante 5 minutos à temperatura ambiente. A uma alíquota de 500 μl de extracto foi adicionada a uma solução contendo 20% TCA (Ridel-De Haën), 0,65% TBA (Sigma) e 0,01% de BHT (Merck). A mistura foi homogeneizada e incubada a 95 °C, durante 25 minutos. Posteriormente os microtubos foram transferidos para um banho de água e gelo, para arrefecimento rápido da mistura, e centrifugados (Eppendorf, 5415 D) a 5 000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de malonaldeído (MDA). A leitura da absorvência foi efectuada a dois comprimentos de onda, a 600 nm (para subtracção de pigmentos fenilpropanóides como

as antocianinas) e a 532 nm (comprimento de onda de máxima absorção do cromóforo avermelhado-rosa formado). A peroxidação de lípidos foi expressa em nmol de MDA/g peso fresco, utilizando o coeficiente de extinção molar do MDA, $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, através da seguinte equação:

$$\text{Equivalentes MDA (nmol/g peso fresco)} = \frac{[(A_{532} - A_{600})/155\ 000] \cdot 10^6}{\text{Massa (g peso fresco)}}$$

9. Tratamento estatístico dos resultados

O tratamento estatístico dos resultados foi efectuado utilizando uma análise de variância (ANOVA) (EXCEL 2003), considerando um nível de confiança de 95%.

III. Resultados

1. Ensaio *in vivo*

O ensaio *in vivo*, foi efectuado com cultivares de plantas de citrinos envasadas e realizado na Universidade de Huelva. As árvores de ‘Valencia late’/Citranjeira Carrizo (V/CC), ‘Nova’/Citranjeira Carrizo (N/CC), ‘Valencia late’/*Citrus macrophylla* (V/CM) e ‘Nova’/*Citrus macrophylla* (N/CM), com aproximadamente um ano, foram adquiridas em viveiro. Estas cultivares foram submetidas a stresse salino durante quatro meses, utilizando diferentes modalidades de 1, 3 e 6 dS/m.

1.1 Elementos minerais: cloretos, sódio, potássio e cálcio

A análise mineral foi efectuada após 1, 2, 3 e 4 meses de aplicação de rega com diferentes concentrações de sal.

Pela análise da Fig. 7, verificou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da concentração de Na^+ intracelular, à medida que a concentração de NaCl foi aumentando na água de rega para as cultivares testadas, em diferentes porta-enxertos e ao longo do tempo.

Verificou-se que até aos 3 meses de rega com as soluções de 3 e 6 dS/m, a concentração de Na^+ aumentou, contudo a partir dos três meses e até ao final do ensaio, observou-se uma tendência de manutenção da concentração de Na^+ , especialmente nas cultivares enxertadas em CC (Fig. 7a).

Após os 4 meses de aplicação de stresse salino, o aumento percentual de Na^+ para N/CC e V/CC, foi de aproximadamente 83 e 69%, respectivamente, quando aplicado 6 dS/m e quando comparado com o controlo. Relativamente às combinações N/CM e V/CM (Fig. 7b), o aumento percentual de Na^+ foi de cerca de 63 e 91%.

Para as quatro combinações testadas verificou-se que, a concentração de Na^+ intracelular foi superior quando aplicada a solução de 6 dS/m, relativamente a 1 e 3 dS/m.

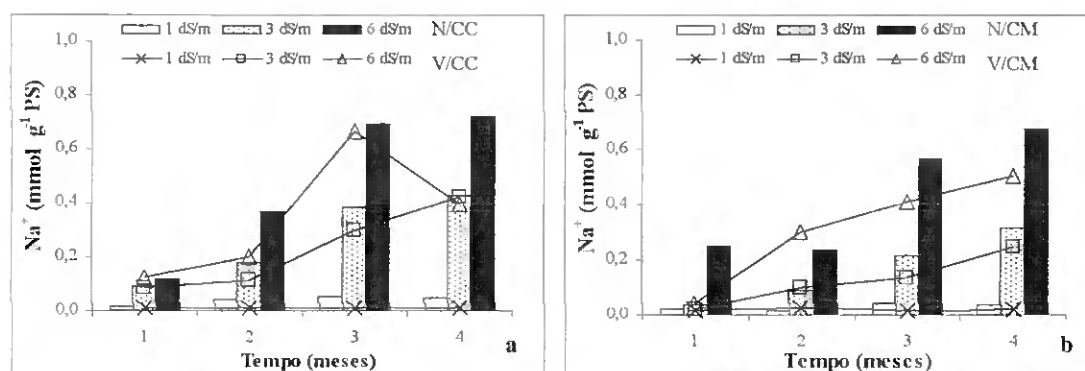


Figura 7 - Acumulação de sódio intracelular em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (b) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*.

Na Fig. 8 está representada a evolução da concentração de Cl^- ao longo do tempo, para as diferentes modalidades e cultivares testadas. Quando aplicada a solução de 3 dS/m às cultivares, verificou-se que a concentração de Cl^- intracelular, foi muito inferior comparativamente à concentração obtida quando aplicada a solução de 6 dS/m.

Os níveis deste ião foram igualmente aumentando ($P < 0,05$), à medida que a concentração de NaCl nas soluções de rega foi aumentado e ao longo do tempo. Contudo, a partir dos três meses de aplicação de sal, verificou-se uma tendência para manter os níveis de Cl^- intracelular, relativamente constantes.

Após os 4 meses de aplicação de stresse salino, e para 6 dS/m o aumento percentual de Cl^- para as combinações N/CM e V/CM (Fig. 8b), foi de aproximadamente 67 e 71%, respectivamente. Para as combinações N/CC e V/CC (Fig. 8a) o aumento percentual de Cl^- foi de aproximadamente 78 e 59%, respectivamente.

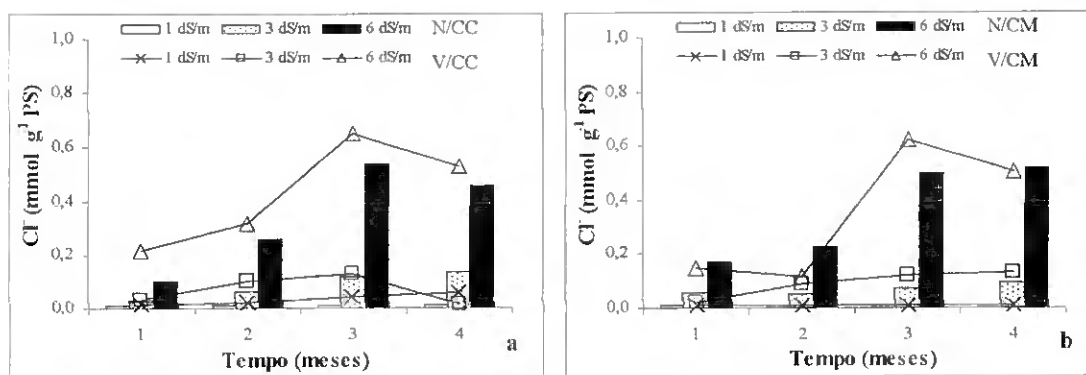


Figura 8 - Acumulação de cloro intracelular em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (b) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*.

Relativamente ao ião K^+ , verificou-se que ocorreu um decréscimo geral da sua concentração (N/CC e V/CC, 52 e 24%, respectivamente, para 6 dS/m) nas folhas das cultivares enxertadas em CC, à medida que a concentração de NaCl aplicada foi aumentando e ao longo do tempo (Fig. 9a). Para o porta-enxerto CM (Fig. 9b), a diminuição da concentração de K^+ durante o tempo de não foi tão acentuada, especialmente na cultivar 'Valencia late'. No entanto, para N/CM, verificou-se uma diminuição acentuada da concentração de K^+ em cerca de 43%, para um valor de CE de 6 dS/m. Aparentemente, a diminuição da concentração de K^+ com a salinidade foi mais notória em CC, comparativamente a CM.

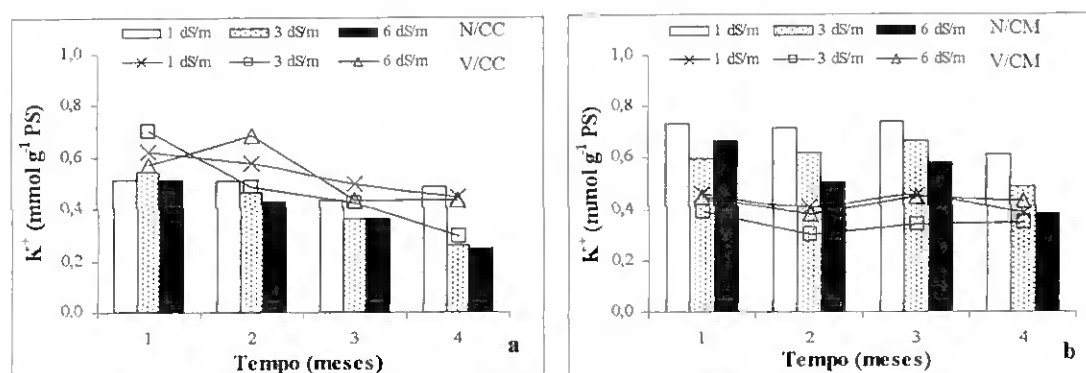


Figura 9 - Acumulação de potássio intracelular em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (b) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*.

Relativamente ao ião cálcio (Ca^{2+}), verificou-se que para as cultivares testadas, ocorreu uma diminuição do valor da concentração, nos primeiros dois meses de tratamento, mas após este período, os níveis do ião aumentaram, para voltarem a baixar no último mês, quando aplicada a solução de rega de 6 dS/m. No entanto, apenas em N/CC e V/CC (Fig. 10a), foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre modalidades e tempo de tratamento, respectivamente. Em V/CM (Fig.10b), verificou-se que a concentração de Ca^{2+} intracelular, foi superior comparativamente às restantes combinações de citrinos testadas.

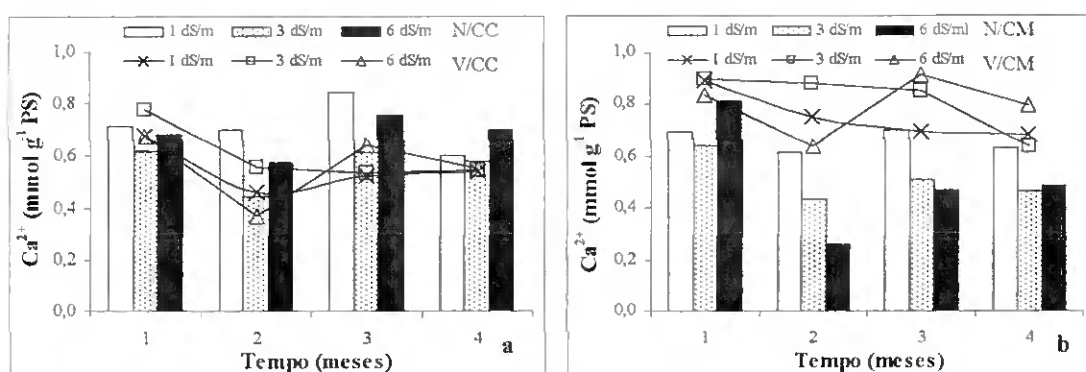


Figura 10 - Acumulação de cálcio intracelular em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (b) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*.

Na Fig. 11 estão representados os valores da razão K^+/Na^+ ao longo do tempo, para as diferentes modalidades. Para as quatro combinações de citrinos testadas, verificou-se que o valor desta razão foi diminuindo com o tempo de tratamento e com a concentração de NaCl aplicada. Na combinação N/CC, a partir dos três meses de rega com 3 e 6 dS/m os valores da razão K^+/Na^+ foram inferiores a 1, sendo que após os quatro meses de estudo os valores foram de 0,6 e 0,3, para 3 e 6 dS/m, respectivamente. Na combinação N/CM, só após os quatro meses de rega com a solução de 6 dS/m, o valor foi inferior a 1 (0,5). Para as combinações V/CC e V/CM, os valores da razão K^+/Na^+ mantiveram-se relativamente acima de 1.

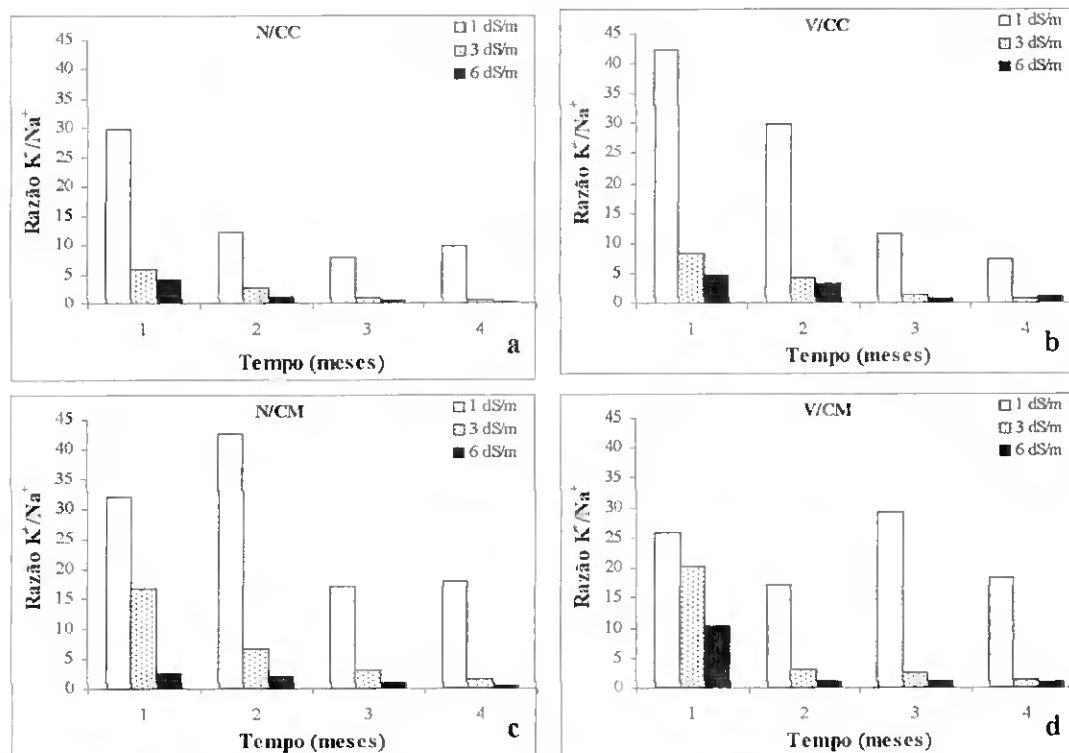


Figura 11 - Variação da razão K^+/Na^+ em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova' x Citranjeira Carrizo; (b) V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (c) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; (d) V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*.

Com o porta-enxerto CC (Fig. 11a e 11b), obtiveram-se valores da razão K^+/Na^+ mais baixos, comparativamente ao porta-enxerto CM (Fig. 11c e 11d).

Relativamente às cultivares verificou-se que para a 'Valencia late', os valores da razão K^+/Na^+ foram ligeiramente superiores em relação à cultivar 'Nova'.

1.2 Actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo

A actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo, foi determinada no tempo 0 e após 3 meses de aplicação de sal nas diferentes modalidades testadas (1, 3 e 6 dS/m). Os enzimas analisados foram a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato

peroxidase (APX), com o objectivo de verificar uma eventual resposta ao stresse oxidativo, provocado pela salinidade.

1.2.1 Superóxido dismutase

Na Fig. 12, está representada a actividade específica da SOD ao longo do tempo. Verificou-se que após três meses de tratamento com as diferentes soluções de rega (CE de 1, 3 e 6 dS/m), a actividade do enzima não aumentou, nas cultivares estudadas. Verificou-se um decréscimo da actividade específica da SOD, após 3 meses de aplicação de stresse salino, especialmente em N/CC (Fig. 12a), V/CC (Fig. 12b) e V/CM (Fig. 12d).

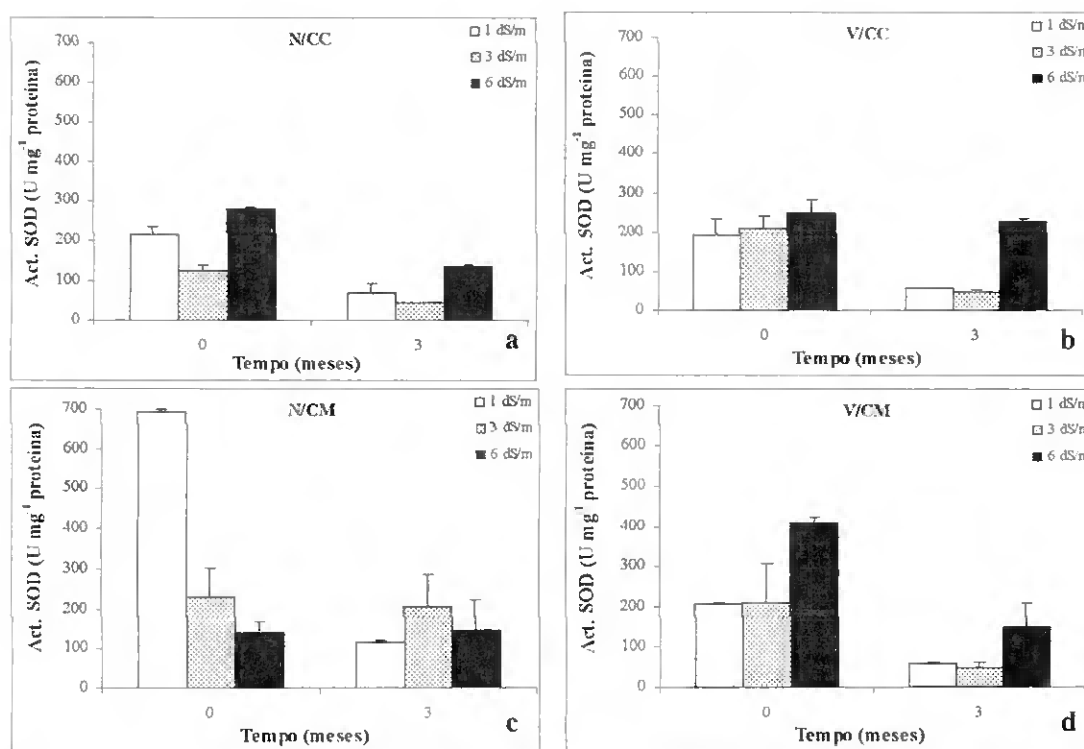


Figura 12 - Actividade específica da SOD em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; (b) V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (c) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; (d) V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*. As barras correspondem ao erro padrão.

De acordo com os resultados obtidos, aparentemente o enzima não foi induzido pelo stresse salino, e pelo facto da actividade específica ser superior no tempo 1, poderá indicar que este é um enzima constitutivo, nestas cultivares.

1.2.2 Catalase

A determinação da actividade específica do enzima CAT nas combinações N/CM (Fig. 13c) e V/CM (Fig. 13d), submetidas a stresse salino, permitiu constatar que após 3 meses de tratamento, foram as que apresentaram os valores relativamente mais elevados de actividade, quando aplicada a solução de 6 dS/m de CE (aumento de 98 e 86%, respectivamente).

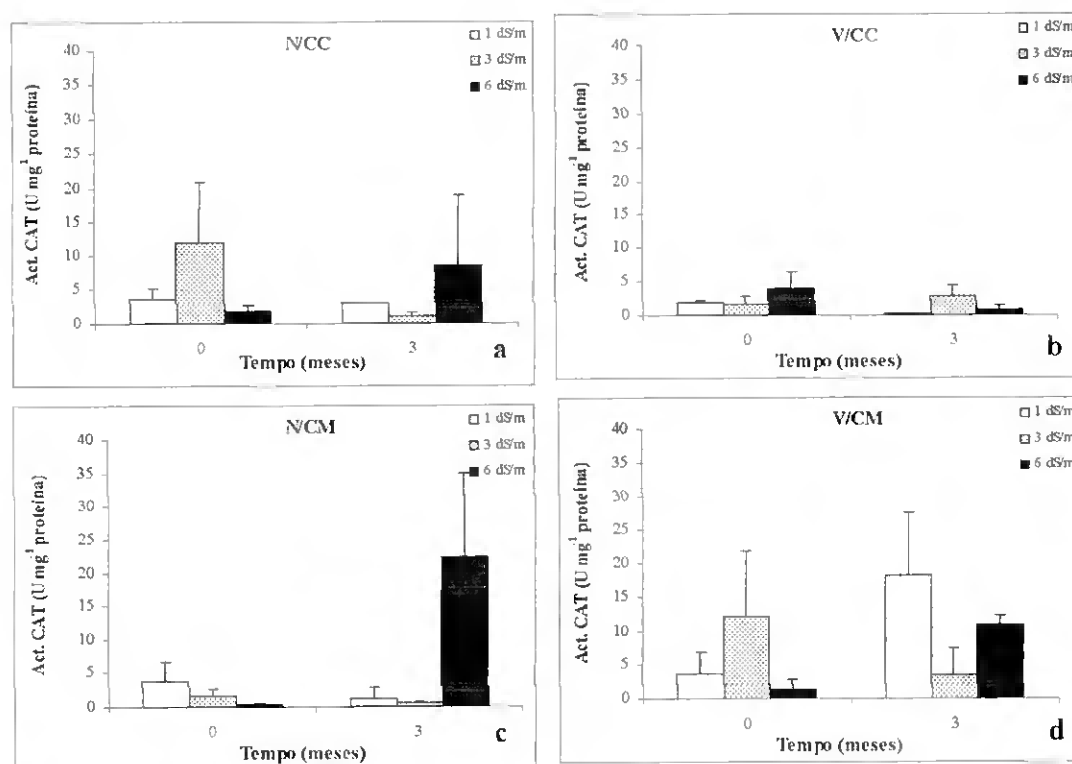


Figura 13 - Actividade específica da CAT em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; (b) V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (c) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; (d) V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*. As barras correspondem ao erro padrão.

Relativamente às cultivares enxertadas em CC, apenas com a 'Nova', observou-se um ligeiro aumento da actividade específica da CAT, quando submetida a um valor de 6 dS/m.

1.2.3 Ascorbato peroxidase

Na Fig. 14, está representada a actividade específica da APX ao longo do tempo. Verificou-se que ocorreu um aumento da actividade específica do enzima (cerca de 3 vezes), quando aplicada a solução de 6 dS/m e após três meses de tratamento, para as duas cultivares enxertadas em CC e CM. Para a combinação N/CM (Fig. 14c) também se registou um ligeiro aumento da actividade específica do enzima, para o valor de 3 dS/m de CE.

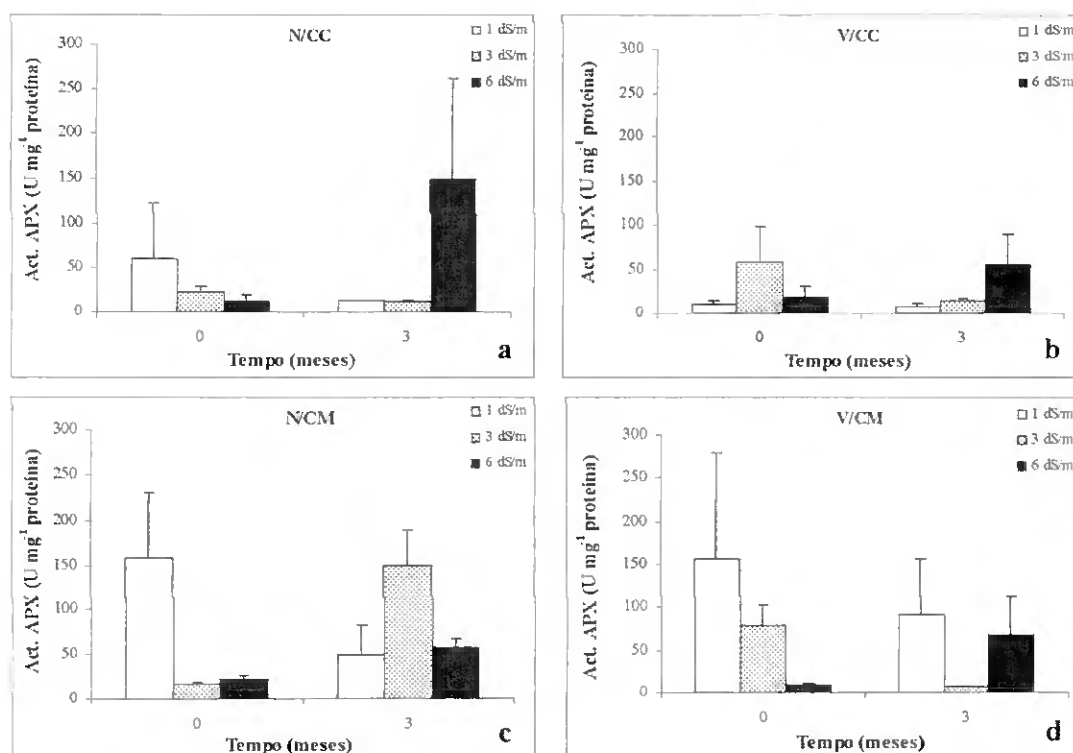


Figura 14 - Actividade específica da APX em folhas de cultivares de citrinos submetidos a NaCl e ao longo do tempo: (a) N/CC, 'Nova'/Citranjeira Carrizo; (b) V/CC, 'Valencia late'/Citranjeira Carrizo; (c) N/CM, 'Nova'/*C. macrophylla*; (d) V/CM, 'Valencia late'/*C. macrophylla*. As barras correspondem ao erro padrão.

2. Ensaio *in vitro*

No ensaio com as cultivares de citrinos, 'Nova' e 'Valencia late' testadas no porta-enxerto Citranjeira Troyer B2, os discos de folhas com 10 mm de diâmetro foram incubados numa solução de referência (ver II, 2), de 6 dS/m (68,12 mM de NaCl) e/ou 2,5 mM de silício, durante 24 horas a 26 °C.

2.1 Elementos minerais: silício, cloretos, sódio, potássio e cálcio

Neste ensaio, foi determinada a concentração de Si após o período de incubação por forma a verificar se tinha ocorrido a acumulação deste elemento nas células.

Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) na concentração de Si, para os diferentes tratamentos aplicados (Fig. 15).

No entanto, entre as cultivares testadas existem diferenças significativas ($P < 0,05$).

Desta forma, verificou-se que os níveis de Si intracelular, determinados em N/T foram cerca de 2 vezes superiores aos obtidos para V/T, como é possível observar através da Fig. 15.

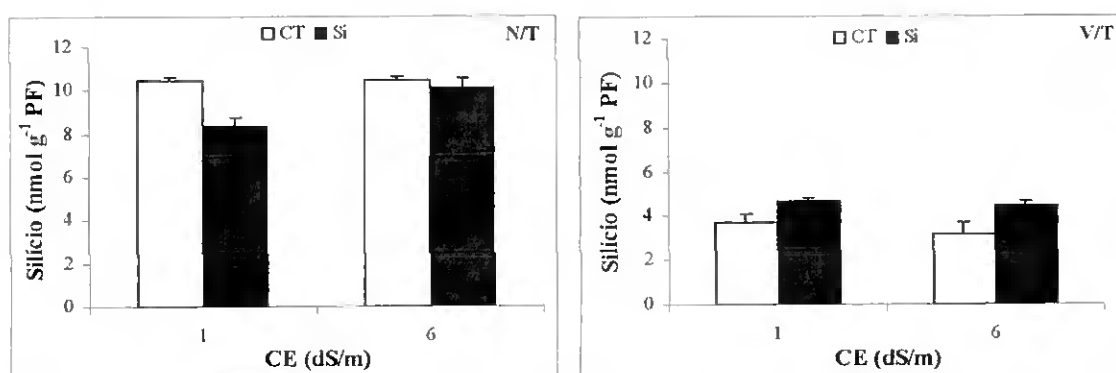


Figura 15 - Acumulação de silício em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício As barras verticais correspondem ao erro padrão.

Na Fig. 16, está representada a concentração de Cl^- intracelular determinada após o tempo de incubação dos discos, em diferentes soluções. Para ambas as cultivares estudadas, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre tratamentos aplicados e entre as cultivares estudadas. No entanto, pela análise da Fig. 16, verificou-se um ligeiro aumento da concentração de Cl^- na presença de 6 dS/m, para ambas as combinações testadas.

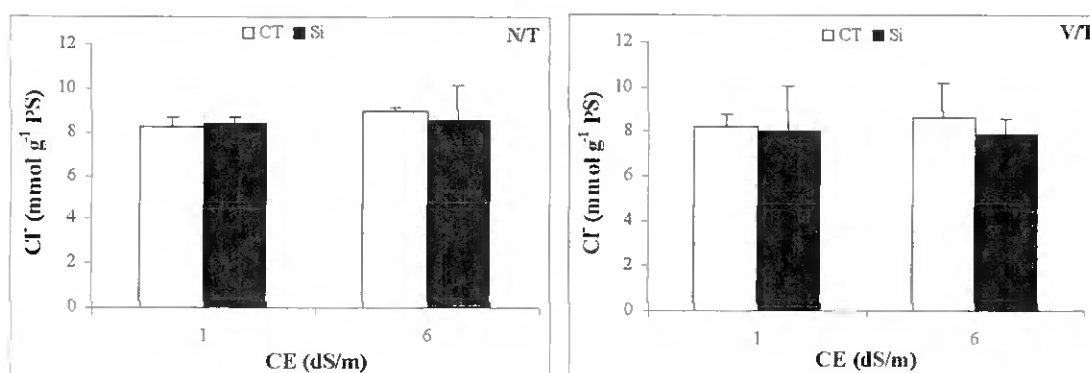


Figura 16 - Acumulação de cloretos em discos de folhas de cultivar de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

Relativamente ao ião Na^+ , verificou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da sua concentração nos discos de folhas, para ambas as cultivares testadas (Fig. 17), e um valor de CE de 6 dS/m e após 24 horas de incubação.

Em V/T, a presença de Si na concentração de 2,5 mM diminuiu o transporte de Na^+ para o interior das células, resultando numa diminuição da concentração intracelular deste ião, nos discos de folhas, sendo esse efeito mais notório quando o Si foi aplicado sem NaCl (diminuição de cerca de 26%, em relação à solução controlo sem Si).

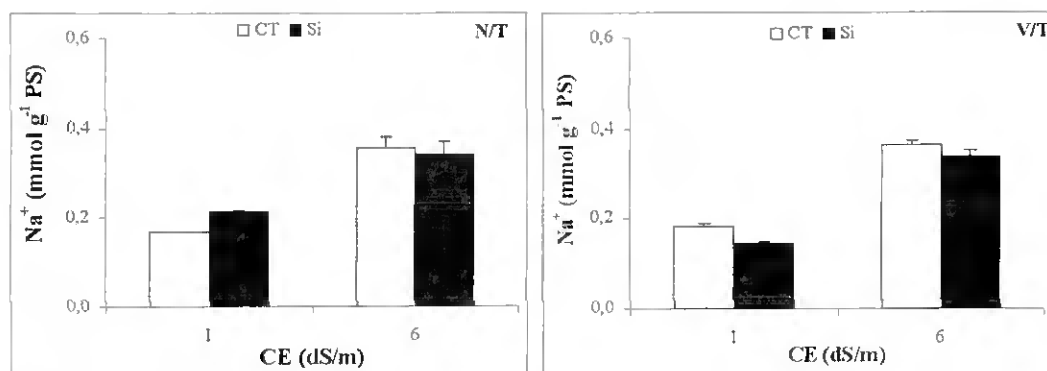


Figura 17 - Acumulação de sódio em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

A determinação do teor de K^+ , nos discos de folhas das cultivares 'Nova' e 'Valencia late' no porta-enxerto Troyer, visou verificar se a presença de Na^+ afectaria o seu transporte e consequente acumulação. Desta forma, em ambas as cultivares, 'Valencia late' e 'Nova', os níveis de K^+ intracelular nos discos de folhas mantiveram-se relativamente constantes, quando aplicada a solução de 6 dS/m em relação ao controlo (1 dS/m) (Fig. 18). Na presença de Si, observou-se apenas uma tendência deste elemento, em aumentar ligeiramente a concentração de K^+ , nos discos de folhas de ambas as cultivares.

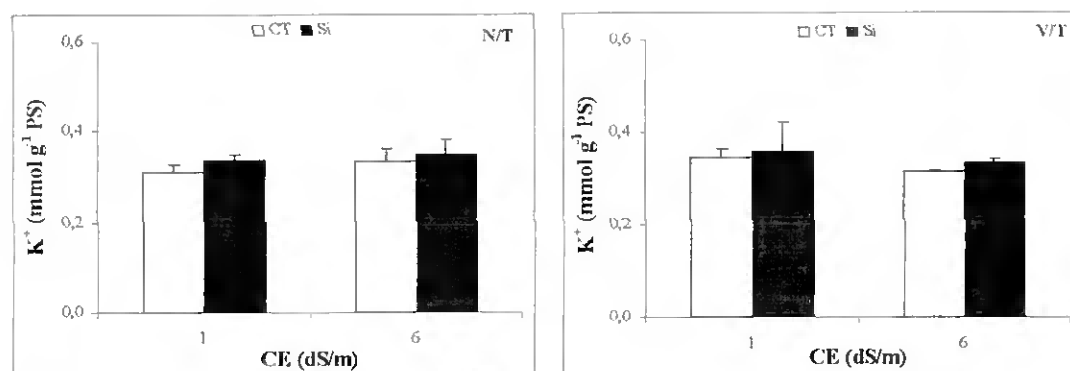


Figura 18 - Acumulação de potássio em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

Relativamente à variação da razão K^+/Na^+ , os valores obtidos estão representados na Fig. 19. Verificou-se que na combinação N/T ocorreu uma diminuição do valor da razão K^+/Na^+ em cerca de 49%, quando os discos foram submetidos a 6 dS/m sem Si. No entanto, a presença deste elemento na solução de incubação com sal, parece ter favorecido o transporte de K^+ para o interior das células na medida em que, o valor da razão aumentou ligeiramente (8%). Relativamente à combinação V/T, verificou-se que a perda de K^+ em detrimento de Na^+ sob salinidade foi ligeiramente superior, comparativamente à N/T. Quando os discos foram incubados na solução de 6 dS/m verificou-se que, comparativamente ao controlo (sem sal), a diminuição foi de aproximadamente 54%. A presença de Si na solução de incubação sem sal, aumentou o valor da razão K^+/Na^+ em cerca de 12%, quando associado ao sal, o aumento foi de aproximadamente 23%.

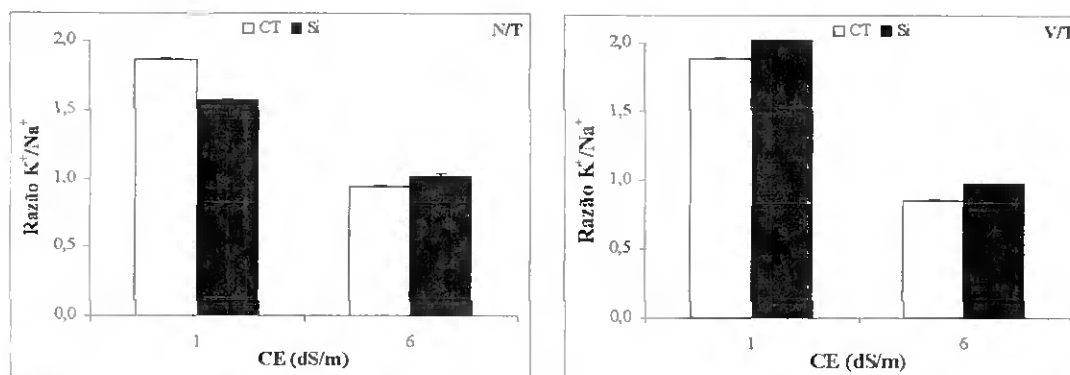


Figura 19 - Variação da razão K^+/Na^+ em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e Si. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão

Relativamente à concentração do ião Ca^{2+} , determinada em ambas as cultivares e para os diferentes tratamentos aplicados, apenas foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$), entre cultivares testadas.

Na cultivar ‘Nova’ verificou-se que, na presença de 6 dS/m, a concentração de Ca^{2+} diminuiu em cerca de 11%, relativamente ao controlo (1dS/m). Aparentemente, o Si contribuiu para a diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular (Fig. 20).

Em V/T, a aplicação de Si parece ter influenciado a acumulação de Ca^{2+} nos discos de folhas, uma vez que de acordo com a Fig. 20, ocorreu um ligeiro aumento da concentração deste ião, na presença de Si, com ou sem NaCl. Ainda nesta cultivar, verificou-se que a aplicação de 6 dS/m diminuiu a concentração de Ca^{2+} em cerca de 44%, comparativamente ao controlo (1 dS/m).

É de salientar que os níveis de Ca^{2+} intracelular nos discos de folhas da cultivar N/T, foram aproximadamente duas vezes superiores aos obtidos para V/T, como se verifica na Fig. 20.

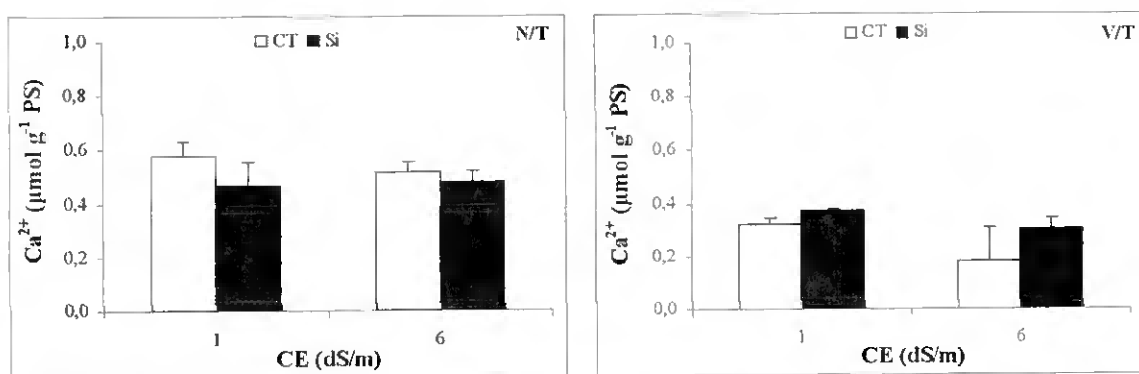


Figura 20 - Acumulação de cálcio em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, ‘Nova’/Troyer B2; V/T, ‘Valencia late’/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

2.2 Teor em prolina

Os níveis de prolina nos discos de folhas, foram avaliados após 24 horas de incubação em soluções de valor de CE de 1 e 6 dS/m e/ou 2,5 mM de Si, a fim de verificar a sua função como osmólito, nesta cultivares de citrinos.

Na Fig. 21 está representada a concentração de prolina nos discos de folhas, de ambas as cultivares, após o período de incubação. Pela análise dos resultados, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) na concentração deste aminoácido, quando os discos foram incubados em soluções contendo Si e/ou NaCl. No entanto, com a cultivar ‘Valencia late’ parece ter ocorrido um ligeiro aumento do teor em prolina intracelular, para 6 dS/m.

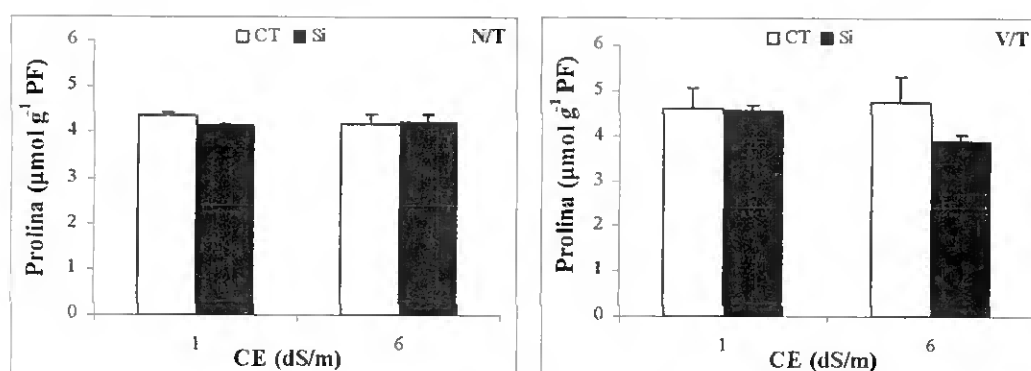


Figura 21 - Teor em prolina em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, ‘Nova’/Troyer B2; V/T, ‘Valencia late’/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

2.3 Actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo

A actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo, nomeadamente da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), foi avaliada após 24 horas de incubação à temperatura de 26 °C, a fim de verificar se a aplicação de NaCl, estaria ou não a provocar stresse oxidativo nos discos de folhas das cultivares.

2.3.1 Superóxido dismutase

Na Fig. 22 está representada a actividade específica da SOD nos discos de folhas, após 24 horas de incubação, em diferentes soluções de 1 e 6 dS/m e/ou 2,5 mM de Si. Verificou-se que em ambas as cultivares, a actividade específica da SOD manteve-se relativamente constante com a aplicação de stresse salino.

A presença de Si, na solução de incubação dos discos de folhas da cultivar ‘Nova’, teve influência na actividade do enzima, aumentando-a ligeiramente (em cerca de 15%). Relativamente à cultivar ‘Valencia late’, verificou-se que a aplicação de Si sem NaCl ou associado a este elemento (6 dS/m), aumentou ligeiramente a actividade específica do enzima em 13 e 26%, respectivamente.

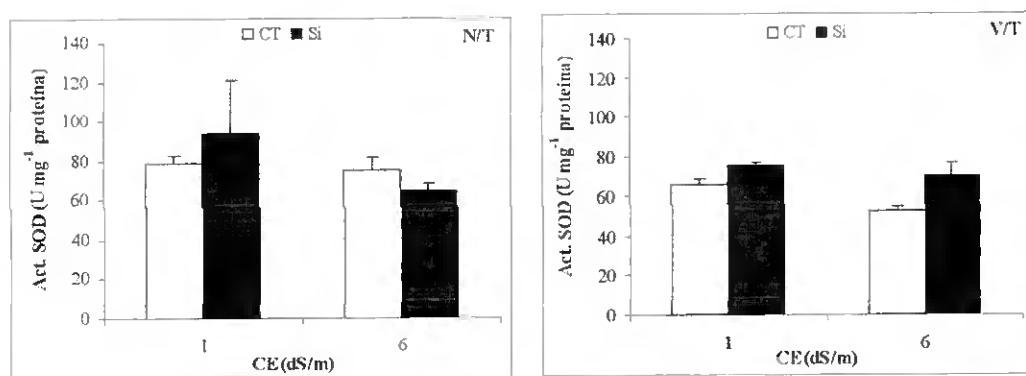


Figura 22 - Actividade específica da SOD em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, ‘Nova’/Troyer B2; V/T, ‘Valencia late’/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

2.3.2 Catalase

Pela análise da Fig. 23, verificou-se um aumento não significativo ($P > 0,05$), da actividade específica da CAT em N/T, na presença de 6 dS/m (NaCl), contrariamente ao

observado para V/T, onde se observou que a actividade manteve-se relativamente constante.

A aplicação de Si, nas soluções de incubação, parece ter contribuído para aumentar a actividade do enzima. Este efeito é notório em N/T quando o Si foi aplicado sem NaCl (aumento de aproximadamente 60%, em relação à solução sem Si), enquanto que na cultivar ‘Valencia late’ o mesmo se verificou quando o Si foi aplicado sem NaCl ou combinado a 6 dS/m de NaCl (aumento de 46 e 69%, respectivamente, em relação às soluções sem Si).

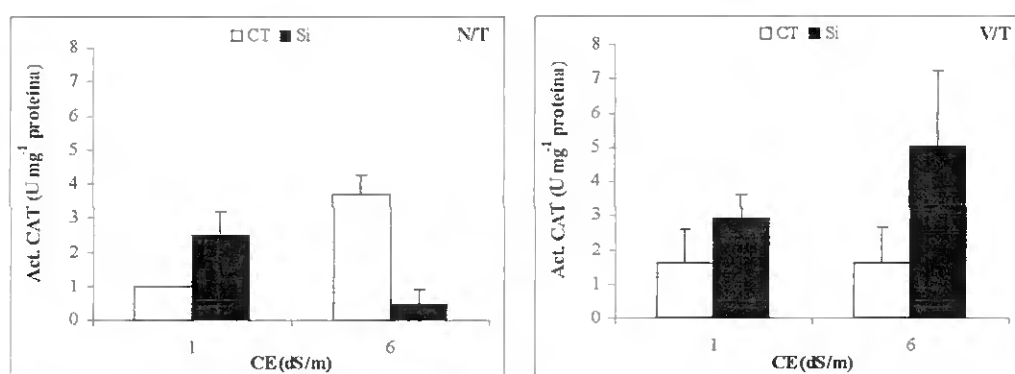


Figura 23 - Actividade específica da CAT em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, ‘Nova’/Troyer B2; V/T, ‘Valencia late’/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

2.3.3 Ascorbato peroxidase

Os dados obtidos para o enzima APX, foram similares aos dados obtidos para a CAT, ou seja pela análise da Fig. 24, verificou-se uma tendência do Si, para aumentar a actividade específica do enzima especialmente em N/T, quando aplicado sem NaCl (aumento de 84%, relativamente à solução sem Si). Também nesta cultivar, para 6 dS/m, ocorreu um aumento são significativo ($P > 0,05$), da actividade do enzima. Na cultivar ‘Valencia late’, verificou-se que o Si contribuiu para o aumento da actividade

do enzima, quando aplicado sem NaCl ou associado a este composto (aumento de 57 e 51%, relativamente às soluções em Si).

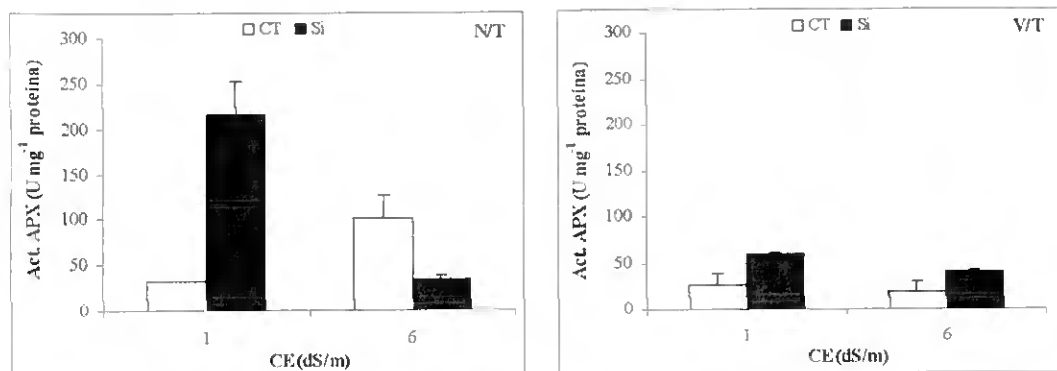


Figura 24 - Actividade específica da APX em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

2.4 Peroxidação de lípidos

Na Fig. 25 está representada a concentração de MDA (malonaldeído) nos discos de folhas, submetidos a diferentes tratamentos, com NaCl e/ou Si, após 24 horas de incubação. Quando aplicadas as soluções de 6 dS/m e/ou 2,5 mM de Si, em ambas as cultivares, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) no teor em MDA, entre tratamentos aplicados e entre cultivares.

Contudo, pode observar-se que em N/T, ocorreu um ligeiro aumento dos níveis de MDA na presença de NaCl (em cerca de 25%), comparativamente ao controlo (1 dS/m). Em V/T, o nível de peroxidação é ligeiramente superior em relação a N/T.

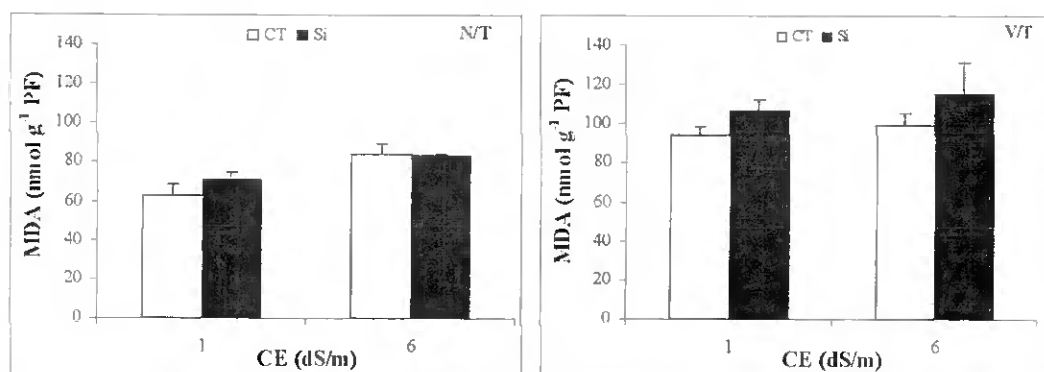


Figura 25 - Concentração de malonaldeído em discos de folhas de cultivares de citrinos, submetidos a NaCl e silício. N/T, 'Nova'/Troyer B2; V/T, 'Valencia late'/Troyer B2. CT-controlo sem Si; Si-com silício. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

3. Ensaio *in vivo* com porta-enxertos

Neste ensaio, utilizaram-se os porta-enxertos Citranjeira Troyer B2 (TR) e Tangerineira Sunki (SK). O tratamento salino foi aplicado durante 28 dias, em plântulas com 4 meses de idade, com concentrações de 1, 3 e 6 dS/m (8,12, 38,12 e 68,12 mM de NaCl, respectivamente). O silício foi aplicado na concentração de 2,5 mM, às plântulas com e sem NaCl.

3.1 Elementos minerais: silício, cloretos, sódio, potássio e cálcio

A determinação de Si foi efectuada, para verificar se este elemento, quando presente, seria utilizado pelas plântulas na redução do stresse salino.

Pela análise da Fig. 26, verificou-se que após 28 dias a concentração de Si aumentou significativamente ($P < 0,05$) no porta-enxerto Sunki, mesmo na presença de NaCl. O aumento percentual em relação ao tempo 0, foi de 53,2, 39,3 e 58,5%, quando o Si foi aplicado sem NaCl ou associado a 3 e 6 dS/m de NaCl, respectivamente.

Relativamente ao porta-enxerto Troyer, verificou-se igualmente uma tendência para o aumento da concentração de Si, após os 28 dias de tratamento, especialmente quando aplicado sem NaCl (cerca de 37,7%) ou associado a 6 dS/m de NaCl (cerca de 35,9%). No entanto, estes aumentos não foram significativos ($P > 0,05$).

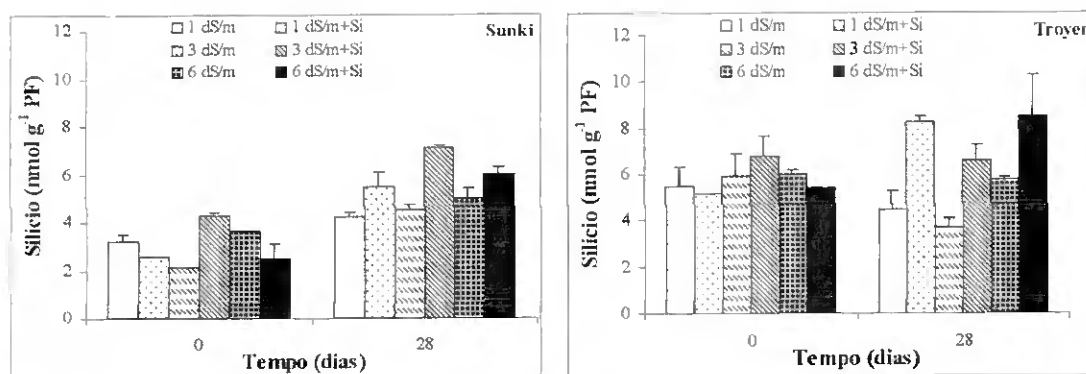


Figura 26 - Acumulação de silício em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos a NaCl, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

Na Fig. 27, está representada a concentração de Cl⁻ intracelular nas folhas dos porta-enxertos submetidos a stress salino e Si, ao longo de 28 dias.

Verificou-se que a concentração de Cl⁻ intracelular nas folhas da Sunki e Troyer, manteve-se relativamente constante ao longo do tempo e para os diferentes tratamentos.

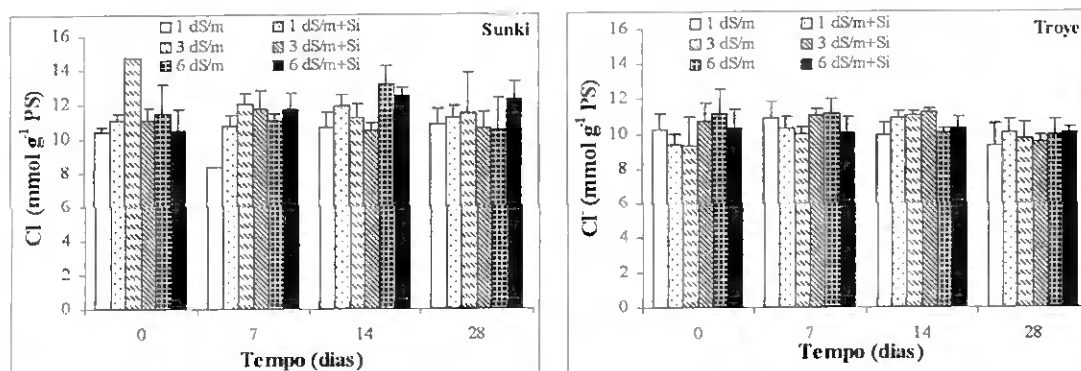


Figura 27 - Acumulação de cloratos em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

A presença de Si na solução de rega, não teve influência na acumulação deste ião ao nível das folhas dos porta-enxertos.

A acumulação de Na^+ intracelular nas folhas das plântulas de porta-enxertos ao longo do tempo, para as diferentes modalidades, também foi verificada, e os dados obtidos estão representados na Fig. 28.

Verificou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da concentração deste ião em aproximadamente 32% para o porta-enxerto Sunki, após os 28 dias de aplicação de NaCl na concentração de 6 dS/m. Para o porta-enxerto Troyer, não foram detectadas diferenças significativas ($P > 0,05$), na concentração de Na^+ durante o tempo de estudo, para ambas as concentrações de NaCl testadas. A presença de Si na água de rega contendo 3 dS/m de NaCl, parece ter diminuído a concentração de Na^+ intracelular, no porta-enxerto Sunki.

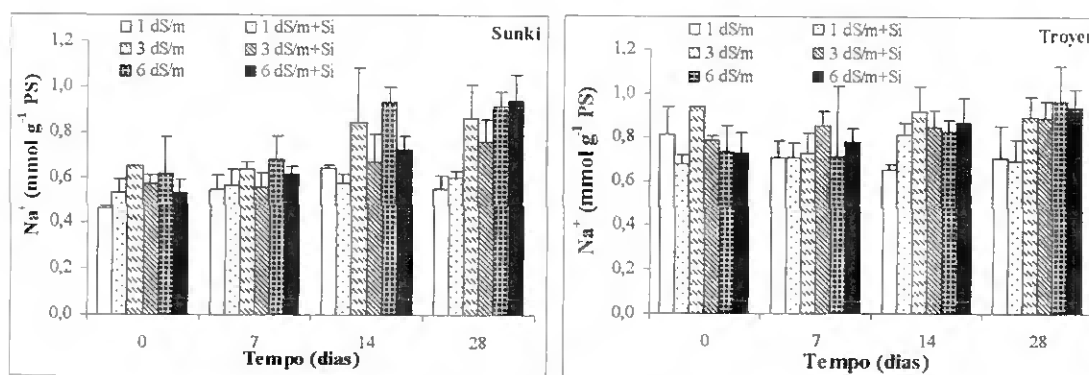


Figura 28 - Acumulação de sódio em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

O efeito da aplicação de NaCl, nos níveis de K^+ intracelular nas folhas das plântulas dos porta-enxertos também foi avaliada. Pela análise da Fig. 29, verificou-se que no porta-enxerto Sunki, a concentração de K^+ diminuiu de forma significativa ($P < 0,05$) ao

longo do tempo, sendo especialmente notório quando aplicado o valor de 6 dS/m (68,12 mM de NaCl) (redução 31 e 44%, para 38,12 mM e 68,12 mM de NaCl, respectivamente).

No porta-enxerto Troyer, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) nos níveis de K^+ , para as duas concentrações de NaCl testadas. É de referir o facto da concentração de K^+ ser superior na Sunki, sendo essa diferença sensivelmente o dobro, em relação à Troyer.

Observou-se um efeito favorável do Si ao transporte de K^+ para o interior das células, uma vez que quando combinado com 3 dS/m de NaCl a redução de K^+ foi de apenas 14% e quando combinado com 6 dS/m a redução foi de apenas 7%, após os 28 dias de estudo e comparativamente ao controlo.

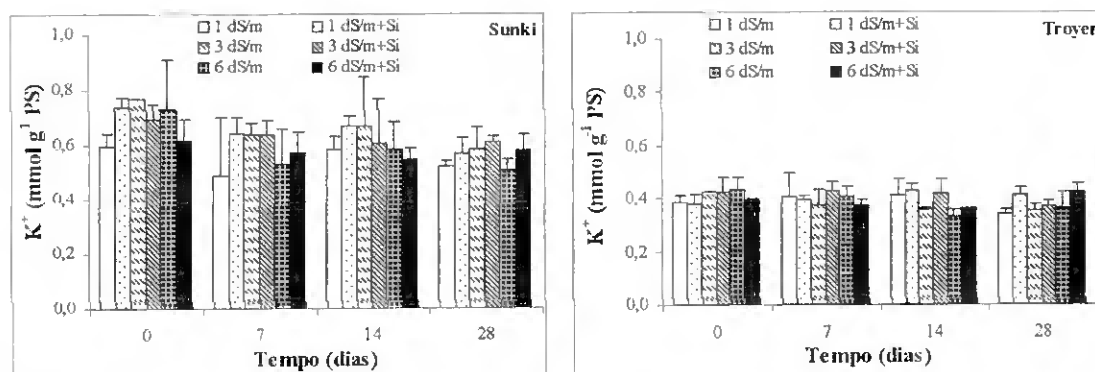


Figura 29 - Acumulação de potássio em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

Pela análise da Fig. 30, é possível observar que a razão K^+/Na^+ foi superior (sensivelmente o dobro) no porta-enxerto Sunki, quando comparado com a Troyer. Na presença de NaCl e após os 28 dias de estudo, verificou-se uma diminuição da razão K^+/Na^+ , no porta-enxerto Sunki em cerca de 43 e 55% quando aplicados os valores de 3 e 6 dS/m, respectivamente, sendo essas diferenças significativas ($P > 0,05$). No entanto,

na presença de 2,5 mM de Si é notório o aumento significativo ($P < 0,05$) do valor desta razão em aproximadamente 4 e 11%, quando associado a 3 e 6 dS/m, respectivamente. No porta-enxerto Troyer, ocorreu uma diminuição percentual do valor da razão K^+/Na^+ , em cerca de 38 e 35% para 3 e 6 dS/m, respectivamente. Quando aplicado Si, juntamente com 3 e 6 dS/m, verificou-se um aumento do valor desta razão em aproximadamente 15 e 18%, respectivamente.

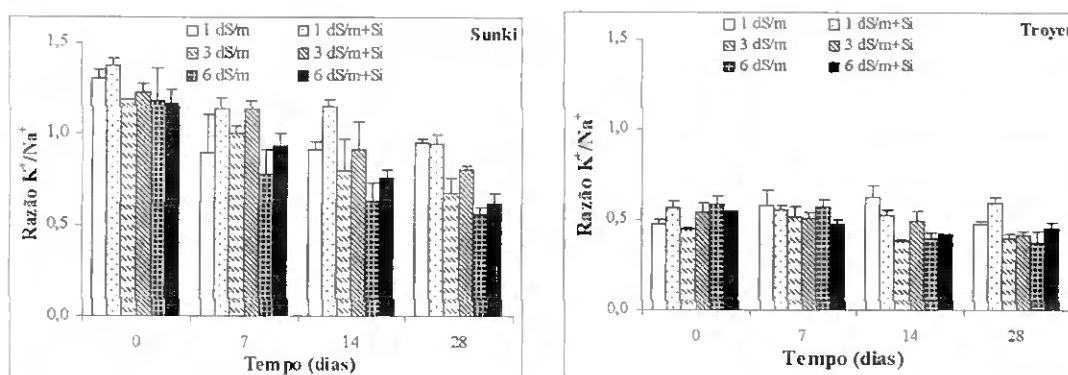


Figura 30 – Variação da razão K^+/Na^+ em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

Na Fig. 31, onde se observa a evolução da concentração de Ca^{2+} ao longo do tempo de estudo, verificou-se que para o porta-enxerto Troyer não existem diferenças significativas ($P > 0,05$), na concentração de Ca^{2+} durante o tempo de exposição ao NaCl e/ou Si.

No entanto, para a Sunki o mesmo não se verificou, uma vez que foram detectadas diferenças significativas ($P < 0,05$) na concentração deste íon, ao longo do tempo. Essas diferenças traduzem-se num aumento da concentração de Ca^{2+} , ao longo do período de estudo, em cerca de 12 e 17%, para o controlo e 6 dS/m.

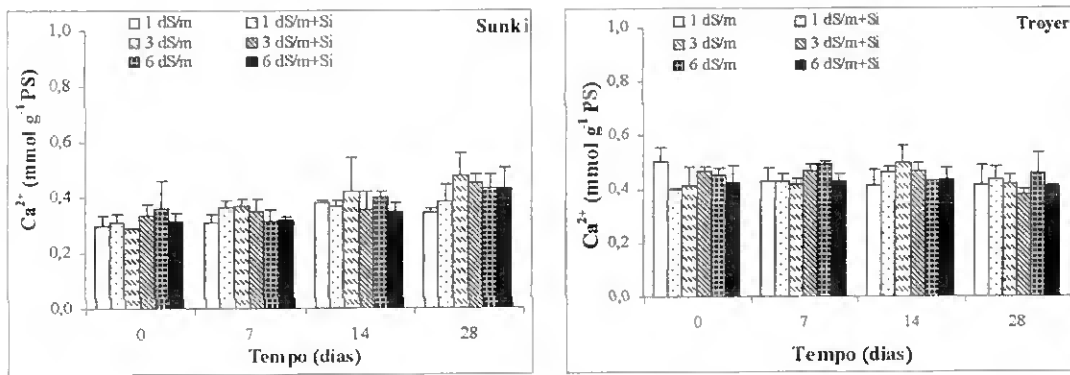


Figura 31 - Acumulação de cálcio em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

Por outro lado, a aplicação de Si conduziu ao aumento da concentração de Ca^{2+} em aproximadamente 20 e 27%, quando aplicado sozinho ou juntamente com 6 dS/m.

3.2 Teor em prolina

Os níveis de prolina nas folhas das plântulas de porta-enxertos, foram avaliados a fim de verificar se este aminoácido funcionaria como osmólito na Sunki e Troyer.

No entanto, pela análise dos resultados obtidos, representados na Fig. 32, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) no teor em prolina, para os vários tratamentos salinos aplicados no porta-enxerto Sunki (Fig. 32). Contudo, verificou-se que os níveis de prolina aumentaram significativamente ($P < 0,05$) ao longo do tempo. Após os 28 dias de estudo, o aumento foi de cerca de 56% quando aplicada a solução de 6 dS/m. O mesmo se observou na presença de Si associado a 6 dS/m, sendo que a concentração de prolina neste caso aumentou em cerca de 67%.

Relativamente ao porta-enxerto Troyer, foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) na concentração de prolina, entre os tratamento salinos aplicados e ao longo dos 28 dias de estudo. Registrou-se um aumento de aproximadamente 44 e 35%, quando

aplicadas as concentrações de 3 e 6 dS/m, respectivamente, após os 28 dias. Neste porta-enxerto, a presença de 2,5 mM de Si, sem NaCl ou associado ao NaCl, não alterou os níveis de prolina, como se pode observar na Fig. 32.

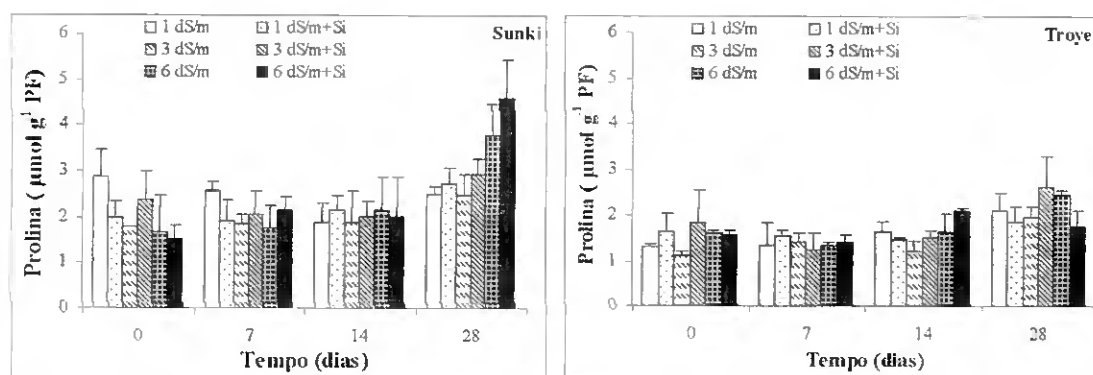


Figura 32 - Acumulação de prolina em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

3.3 Actividade específica dos enzimas de stress oxidativo

A actividade específica dos enzimas de stress oxidativo, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), foi avaliada no tempo 0 e após 7, 14 e 28 dias de rega com diferentes soluções salinas de 1, 3 e 6 dS/m. O efeito de 2,5 mM de silício na actividade dos enzimas também foi avaliado.

3.3.1 Superóxido dismutase

Pela a análise da Fig. 33, verificou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da actividade específica da SOD em ambos os porta-enxertos, à medida que o tempo de aplicação de NaCl aumentou, sendo mais notório após os 28 dias de tratamento. Na Sunki o aumento percentual foi de aproximadamente 68 e 48%, na presença de 3 e 6 dS/m,

respectivamente. Quando aplicada a solução contendo 2,5 mM de Si e 6 dS/m, a actividade específica deste enzima aumentou em cerca de 58%.

Para o porta-enxerto Troyer, também se observaram diferenças significativas ($P < 0,05$) na actividade específica da SOD, ao longo dos 28 dias de tratamento. Quando comparado com o controlo, o aumento foi de aproximadamente 39 e 79% para 3 e 6 dS/m, respectivamente. Nas plântulas regadas com a solução de 6 dS/m contendo Si, foi onde se registou o maior aumento da actividade específica do enzima, cerca de 76%.

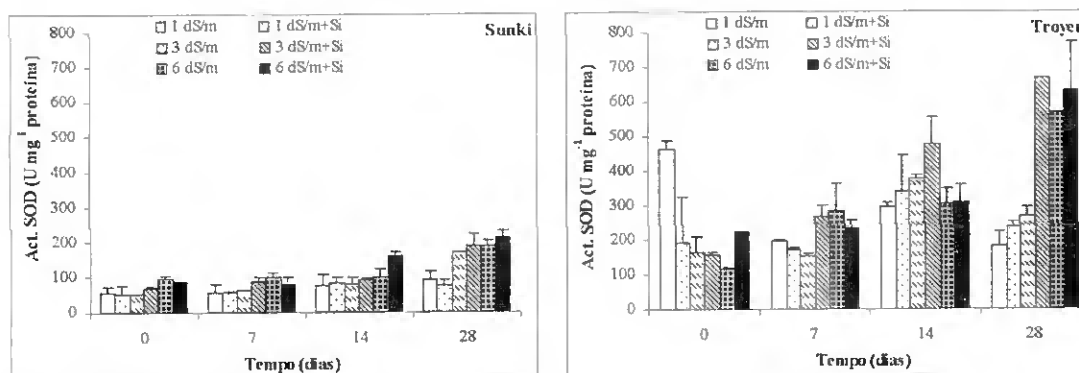


Figura 33 – Actividade específica da superóxido dismutase em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

3.3.2 Catalase

Não foi possível tirar conclusões concretas sobre o efeito da salinidade e/ou Si, na actividade específica da CAT, determinada ao longo do período de estudo para ambos os porta-enxertos. Uma vez que, os valores obtidos não permitiram obter um padrão coerente de evolução da actividade deste enzima com os tratamentos aplicados (Fig. 34). No entanto, considerando apenas os dados obtidos ao fim dos 28 dias e comparando com os dados obtidos para o controlo, é possível observar algumas diferenças na actividade da CAT, especialmente na presença de Si. No entanto, é importante referir que a actividade da CAT, no porta-enxerto Troyer foi cerca de 8

vezes mais elevada, quando comparada com a Sunki, para as modalidades testadas, como se pode observar na Fig. 34. A aplicação de Si, contribuiu para aumentar a actividade da CAT, nas folhas de porta-enxerto, especialmente na Sunki. No entanto, após 28 dias de tratamento, é notório o efeito do Si no aumento da actividade específica da CAT em ambos os porta-enxertos.

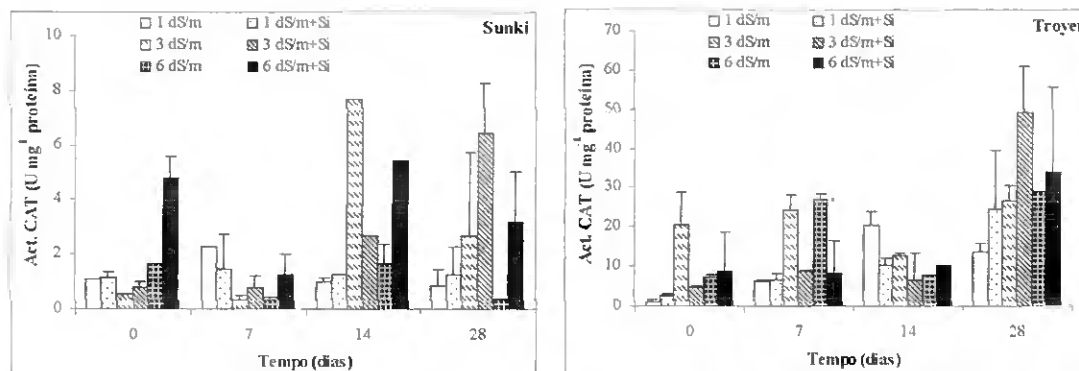


Figura 34 - Actividade específica da catalase em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

3.3.3 Ascorbato peroxidase

Foi notório o aumento significativo ($P < 0,05$) da actividade específica da APX, após 28 dias de estudo especialmente no porta-enxerto Troyer (Fig. 35), quando aplicado NaCl. Esse aumento foi de aproximadamente 60 e 93%, para os valores de 3 e 6 dS/m de CE, respectivamente. Também foi possível observar uma tendência do Si, em contribuir para o aumento da actividade deste enzima, em ambos os porta-enxertos, especialmente a partir dos 14 dias de tratamento, quer aplicado sem NaCl (aumento de 57%, após os 28 dias), ou combinado com 3 e 6 dS/m (aumento de 73 e 84%, respectivamente, ao fim de 28 dias).

No porta-enxerto Sunki, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre tratamentos e tempo de aplicação de NaCl e/ou Si. Contudo, pela análise da Fig. 35, foi

possível verificar que a presença de Si aumentou a actividade da APX, também a partir dos 14 dias de estudo, sendo esse efeito mais notório na presença de 6 dS/m associado a 2,5 mM de Si (aumento de aproximadamente 77%). De salientar que a actividade da APX no porta-enxerto Troyer, foi muito superior (cerca de 10 vezes), quando comparado com a registada para a Sunki.

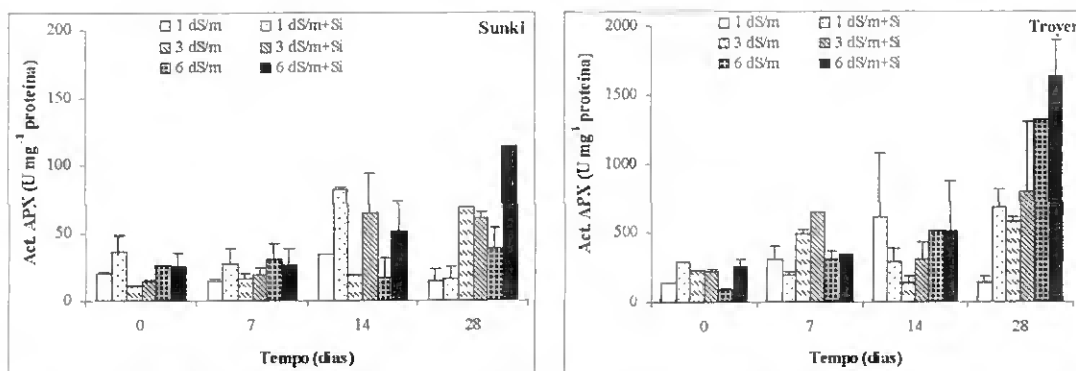


Figura 35 - Actividade específica da ascorbato peroxidase em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

3.4 Peroxidação de lípidos

Por forma a verificar possíveis danos ao nível dos lípidos de membrana das células, submetidas a stresse salino, procedeu-se à determinação da concentração em MDA, os resultados obtidos estão representados na Fig. 36.

Pela análise dos resultados, verificou-se que a rega das plântulas com NaCl nas concentrações de 1, 3 e 6 dS/m, não afectou os níveis de MDA, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$), entre os tratamentos salinos aplicados e o tempo de estudo, para ambos os porta-enxertos.

No entanto, pela análise da figura, verificou-se uma tendência de aumento dos níveis de MDA, quando aplicada a solução de 6 dS/m em ambos os porta-enxertos.

A aplicação de Si, juntamente com 68,12 mM de NaCl, parece ter diminuído os níveis de MDA, em ambos os porta-enxertos, especialmente após os 28 dias de tratamento, sendo este efeito mais acentuado na Sunki. De referir, que os níveis de MDA determinados para o porta-enxerto Troyer, foram cerca de 2 vezes superiores, comparativamente à sunki.

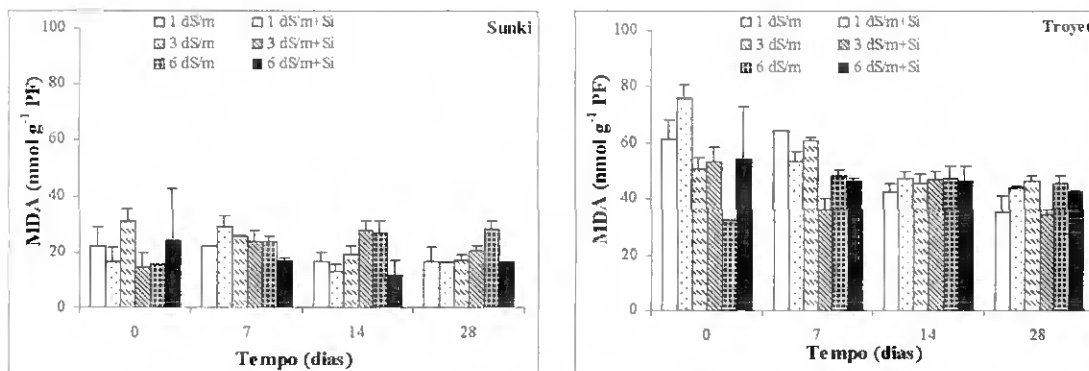


Figura 36 – Acumulação de malonaldeído em folhas de plântulas de porta-enxertos submetidos NaCl e silício, ao longo do tempo. As barras verticais correspondem ao erro padrão.

IV. Discussão dos Resultados

No ensaio realizado com as plantas envasadas, ‘Nova’ e ‘Valencia late’, as modalidades testadas foram de 1, 3 e 6 dS/m de condutividade eléctrica (CE), durante aproximadamente 4 meses. A análise mineral, revelou que nas cultivares estudadas a concentração de Na^+ foi aumentando ao longo do tempo e com o aumento da concentração de sal. No entanto, a partir dos três meses de aplicação de stresse salino, verificou-se que os níveis deste elemento mantiveram-se relativamente constantes, nas cultivares estudadas. Os níveis de Cl^- foram aumentando até aos 3 meses de aplicação de sal na água de rega, para valores de CE de 3 e 6 dS/m. Posteriormente, verificou-se uma tendência de manutenção dos níveis deste elemento (‘Valencia late’/CM e ‘Nova’/CM) ou mesmo de diminuição (‘Valencia late’/CC e ‘Nova’/CC).

Nas cultivares enxertadas em CC, aparentemente o transporte de Na^+ foi superior, o que contraria resultados obtidos anteriormente, onde se constatou que sob condições de salinidade, o transporte de Cl^- é geralmente superior ao de Na^+ (Zekri e Parsons, 1992; Moya *et al.*, 1999). Desta forma, podem ter sido as cultivares a regular o transporte dos iões e a sua acumulação. No entanto, estudos demonstraram a influência da cultivar enxertada na acumulação dos iões nas folhas (Bañuls e Primo-Millo, 1995; Nieves *et al.*, 1992).

Relativamente às cultivares enxertadas em CM, verificou-se que a concentração de Na^+ intracelular foi aumentando ao longo do tempo para as diferentes modalidades, sendo mais notório para os valores de CE de 3 e 6 dS/m nas cultivares testadas. Os níveis de Cl^- foram igualmente aumentando até aos 3 meses de aplicação de sal na água de rega, tempo a partir do qual, os níveis deste elemento estabilizaram. Estes dados estão de acordo com dados descritos em estudos anteriores com o porta-enxerto *C. macrophylla*, onde foi verificado que a concentração de Na^+ aumentou com o tempo de exposição ao NaCl (Ruiz *et al.*, 1997 e 1999). Portanto, aparentemente nas combinações ‘Valencia

late'/CM e 'Nova'/CM, parece ter sido o porta-enxerto a regular o transporte dos iões para as folhas.

Relativamente ao ião potássio (K^+), verificou-se que nas cultivares enxertadas em CC, o decréscimo na concentração deste ião (em relação ao controlo, 1 dS/m), foi superior comparativamente às cultivares enxertadas em CM (ver Fig. 9), para as modalidades 3 e 6 dS/m. Nas duas cultivares enxertadas em CC e na combinação N/CM, verificou-se um decréscimo da concentração de K^+ , enquanto que na combinação V/CM os níveis de K^+ mantiveram-se relativamente constantes, com o aumento da concentração de sal e tempo de aplicação. A redução do transporte de K^+ para o interior das células, provocada pelo Na^+ , é um processo competitivo conhecido (Ball *et al.*, 1987, Cerdá *et al.*, 1995; Cramer *et al.*, 1985), e a deficiência em K^+ provocada pelo Na^+ tem sido a causa da reduzida taxa de assimilação de CO_2 (Ball *et al.*, 1987), conduzindo a uma diminuição da taxa fotossintética, e conseqüente diminuição do crescimento da planta. A diminuição do transporte de K^+ , também pode ser induzido por alterações da integridade da membrana, causado pela substituição de Ca^{2+} pelo Na^+ (Cramer *et al.*, 1985).

Experiências realizadas sob condições controladas, indicam que a elevada concentração de Na^+ no solo ou soluções, reduz o transporte de K^+ e Ca^{2+} pelas plantas e/ou afecta a distribuição interna destes elementos (Grattan e Grieve, 1992).

Os níveis de Ca^{2+} intracelular foram oscilando ao longo do tempo, nas cultivares submetidas a stresse salino, podendo indicar que as células estariam a proceder ao ajuste osmótico, com a finalidade de manterem os níveis de Ca^{2+} intracelular relativamente constantes.

A manutenção de valores elevados da razão K^+/Na^+ intracelular, é um indicativo da tolerância das plantas à salinidade (Yeo, 1998). A razão K^+/Na^+ também fornece alguma

informação acerca do funcionamento dos sistemas de transporte, uma vez que valores inferiores a 1, indicam que a célula não teve a capacidade de manter os níveis de K^+ intracelular (aproximadamente 100 mM), prevalecendo o Na^+ intracelular. Esta perda de K^+ citosólico em detrimento do Na^+ , ocorre devido à similaridade físico-química entre os dois iões, o que conduz à competição pelos locais de ligação do K^+ à entrada para o simplasma, e conseqüentemente à diminuição da concentração de K^+ (Maathuis e Amtmann, 1999).

Verificou-se que em todas as combinações testadas a razão K^+/Na^+ foi diminuindo com o tempo de aplicação e com a concentração de NaCl aplicada. Na cultivar 'Nova' (N/CC e N/CM), a partir dos três meses de aplicação de água de rega de 6 dS/m, o valor da razão K^+/Na^+ foi inferior a 1, sugerindo que nestas combinações, a capacidade de manter os níveis de K^+ intracelular necessário às actividades metabólicas, foi dificultada devido à elevada concentração de Na^+ da água de rega.

De uma maneira geral, na cultivar 'Nova' os níveis da razão K^+/Na^+ foram inferiores aos obtidos para a 'Valencia late'. O mesmo foi verificado, utilizando a Citranjeira Carrizo, ou seja, neste porta-enxerto os níveis da razão K^+/Na^+ foram inferiores comparativamente ao porta-enxerto *C. macrophylla*.

Um dos efeitos adversos do stresse salino nas plantas, está relacionado com a produção de ROS (Especíes Reactivas de Oxigénio), como resultado do stresse oxidativo. Estas espécies (oxigénio molecular, O_2 ; oxigénio singlete, 1O_2 ; radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$; peróxido de hidrogénio, H_2O_2 ; e radical hidróxilo, $\cdot OH$) são produzidas, essencialmente no cloroplasto e na mitocôndria, onde a concentração de oxigénio é elevada devido aos processos metabólicos (fotossíntese e respiração, respectivamente). De entre os mecanismos de defesa de ROS, estão incluídas as respostas enzimática e não-

enzimática. Os enzimas de stresse oxidativo, como a SOD, CAT e APX, são responsáveis pela eliminação parcial ou total de ROS.

Relativamente à análise dos enzimas de stresse oxidativo, verificou-se que o enzima SOD não foi activado, mesmo com o aumento do valor de CE aplicada (ver Fig. 9), uma vez que a actividade específica determinada para as cultivares estudadas após os três meses de aplicação de sal, foi inferior à determinada no tempo 1. Portanto, estes dados sugerem a existência de actividade constitutiva nas quatro combinações de citrinos testadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Ferreira (2005). O facto da actividade específica não ter aumentado com a aplicação de stresse salino, poderá também indicar que actuaram outros mecanismos de defesa não-enzimática contra os ROS eventualmente formados durante o stresse oxidativo, especialmente o anião superóxido (ver I, 3.5), possivelmente pela acção de moléculas antioxidantes, como é o caso do ácido ascórbico (ASC) ou glutathiona (GSH), que também actuam sobre este radical. Arbona e colaboradores (2003), verificaram que a sensibilidade do porta-enxerto Citranjeira Carrizo à salinidade, devia-se essencialmente à intoxicação celular do ião Cl^- e não pelos danos provocados pelo stresse oxidativo, uma vez que ocorreu uma resposta celular a este tipo de stresse, nomeadamente pela utilização de moléculas antioxidantes. No entanto, no presente trabalho, não foram efectuadas análises que permitissem clarificar esta questão.

Pela análise dos resultados obtidos para os enzimas CAT (ver Fig. 13) e APX (ver Fig. 14), onde se verificou um ligeiro aumento da actividade específica com os tratamentos salinos e ao longo do tempo, permitiu constatar que o radical H_2O_2 estaria a ser formado por dismutação enzimática (SOD) ou de moléculas antioxidantes.

No ensaio com discos de folhas, onde foram utilizadas as cultivares ‘Nova’ (N/T) e ‘Valencia late’ (V/T) no porta-enxerto Citranjeira Troyer B2, foi determinada a concentração de Si após 24 h de incubação em soluções de 6 dS/m e/ou 2,5 mM de Si, com o objectivo de verificar se tinha ocorrido o transporte deste elemento pelas células. Verificou-se que em ambas as cultivares testadas no porta-enxerto Troyer, não ocorreu o transporte de Si, uma vez que as diferenças encontradas entre tratamentos não foram significativas ($P > 0,05$). Em termos globais, não foram detectadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para os vários parâmetros analisados, ao longo do tempo e em ambas as cultivares, na presença de NaCl e/ou Si. A excepção foi registada na concentração de Na^+ , na combinação N/T (ver Fig. 17), onde se verificou que a aplicação da solução de 6 dS/m, aumentou significativamente ($P < 0,05$) a concentração do ião. Este aumento parece ter sido relativamente suficiente para activar os enzima CAT e APX, uma vez que os valores da actividade específica dos enzimas aumentou ligeiramente na presença de sal, nas duas cultivares testadas (ver III, 2.3). A actividade específica da SOD, manteve-se relativamente constante em ambas as cultivares. Contudo a presença de Si, nas soluções de incubação parece ter favorecido o aumento da actividade específica dos enzimas em ambas as cultivares. Para a cultivar ‘Nova’, este facto ocorreu quando o Si foi aplicado sem NaCl, e em relação à cultivar ‘Valencia late’, quando aplicado com e sem o sal.

Relativamente à razão K^+/Na^+ , verificou-se que em ambas as cultivares, ocorreu uma diminuição do valor da razão K^+/Na^+ , sendo ligeiramente inferior na cultivar ‘Valencia late’, quando os discos foram submetidos a 6 dS/m sem Si. Quando adicionado às soluções de incubação com e sem sal, verificou-se que este elemento aparentemente favoreceu o transporte de K^+ para o interior das células. Na combinação N/T, este facto foi observado na presença de NaCl, enquanto que na combinação V/T, quando o Si foi

adicionado com e sem o sal. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Liang, 1999), onde se verificou que concentração de Na^+ diminuiu (cerca de 12%) nas folhas quando a planta da cevada foi submetida a 120 mM de NaCl e 1 mM de Si, comparativamente ao controlo onde o Si não foi adicionado. O mesmo autor, também verificou, nas mesmas condições de ensaio, que a concentração de K^+ aumentou na presença de Si (cerca de 25%).

Quando a concentração de Na^+ é elevada, no apoplasto ou vacúolo das folhas, as células têm dificuldade em manter os níveis de Na^+ citosólico baixos, e conseqüentemente da razão K^+/Na^+ (Gorham *et al.*, 1990; Dubcovsky *et al.*, 1996; Maathuis e Amtmann, 1999). No entanto, nestas combinações de citrinos verificou-se que apesar da concentração de Na^+ (68,12 mM, equivalente a 6 dS/m) ser relativamente elevada para citrinos, as células aparentemente tiveram a capacidade de manter o valor da razão K^+/Na^+ acima de 1, indicando uma boa manutenção dos níveis de K^+ intracelular.

Os níveis de malonaldeído (MDA) e prolina determinados, mantiveram-se relativamente constantes entre os tratamentos aplicados. Pela análise dos resultados obtidos neste ensaio, nas condições referidas (ver II, 2), possivelmente a prolina não funcionou como osmólito nestas cultivares de citrinos. A concentração inicial de prolina nos discos de folhas nas soluções controlo (sem NaCl), foi elevada sugerindo que este aminoácido poderá ser constitutivo nestas cultivares, como já havia sido indicado por Briens e Larher (1982).

Estudos realizados com discos de folhas de outras espécies de plantas, nomeadamente tomateiro, em que foram utilizadas concentrações de NaCl mais elevadas (até 300 mM), verificou-se que a concentração em prolina foi aumentando (Aziz *et al.*, 1999). No entanto, noutros estudos também realizados em discos de folhas de espinafre (*Spinacia*

oleracea L.) e canola (*Brassica napus* L.), foi referido que apesar da importância da prolina no restabelecimento da turgescência nos discos de folha sujeitos a stress salino, o facto da sua concentração aumentar tardiamente seria indicativo que este aminoácido não desempenhava uma função primária no ajuste osmótico, o que não excluiria a sua contribuição na recuperação da homeostase interna que pode ter lugar em fases mais tardias (Larher *et al.*, 2003).

O facto de não terem sido detectadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para os vários parâmetros analisados, e em especial na actividade específica dos enzimas SOD, CAT e APX, poderá estar relacionado com mecanismos de defesa celular utilizados pela célula, nomeadamente na exclusão de iões tóxicos (Na^+ e Cl^-), na sua compartimentação nos vacúolos (caso ocorra o transporte desses iões) e mecanismos de defesa não-enzimática, utilizados pelas células, para ultrapassar um eventual stresse oxidativo a que foram submetidas. Desta forma, e admitindo que possa ter ocorrido a formação de ROS com a aplicação de 6 dS/m, estes poderão ter sido eliminados (não pelos enzimas de stresse oxidativo), mas por outras moléculas com função antioxidante, como polifenóis e outros compostos não-polares (Arbona *et al.*, 2003), referidos anteriormente.

Pela análise global dos resultados obtidos nos ensaios com discos de folhas, a concentração de NaCl aplicada (6 dS/m ou 68,12 mM) durante 24 h, apenas afectou os níveis de Na^+ . Os resultados indicaram que a presença de Na^+ na concentração de 6 dS/m, poderá não ter tido efeito no transporte de K^+ pelas células.

Possivelmente a concentração de NaCl testada pode não ter sido suficiente para provocar um desequilíbrio na concentração de K^+ , e provocar stresse osmótico e oxidativo nas células. Por outro lado, o Na^+ poderia estar a ser acumulado nos vacúolos sem que causa-se stresse oxidativo, uma vez que a actividade específica dos enzimas

não foi alterada. No entanto, verificou-se que a presença de Si, contribuiu para aumentar a actividade específica dos enzimas em ambas as cultivares.

Nos dois ensaios realizados, *in vivo* e *in vitro*, utilizando as cultivares ‘Nova’ e ‘Valencia late’, verificou-se que o ião Na^+ foi aumentando ao longo do tempo, para 6 dS/m. Tendo em conta que de acordo com Walker (1986), o porta-enxerto Citranjeira Troyer B2 tem a capacidade de excluir Na^+ , acumulando mais Cl^- , então parece ter sido, também nestes ensaios *in vitro*, a cultivar ‘Nova’ a influenciar a acumulação do ião Na^+ nas folhas (à semelhança do observado para as combinações N/CC e N/CM).

O estudo *in vivo* com plântulas de porta-enxertos, foi efectuado durante 28 dias, utilizando além do controlo, soluções de 3 e 6 dS/m e/ou 2,5 mM de silício (Si). De acordo com os dados obtidos pela análise mineral aos iões Na^+ e Cl^- , verificou-se que no porta-enxerto Sunki, a concentração do ião Na^+ foi aumentando significativamente ($P < 0,05$), ao longo dos 28 dias de estudo quando aplicado o NaCl (aumento de 0,6 para 0,9 mmol/g peso seco, para 6 dS/m), enquanto que a concentração de Cl^- manteve-se sensivelmente constante (~10 mmol/g peso seco). Estes dados estão de acordo com dados bibliográficos, onde é referido que este porta-enxerto tem elevada capacidade para excluir Cl^- (Maas, 1993) e resistir ao stresse salino (Paranychianakis e Chartzoulakis, 2005).

No porta-enxerto Troyer, as concentrações de Na^+ e Cl^- mantiveram-se relativamente constantes, ao longo do tempo e para os diferentes tratamentos aplicados, embora os valores de Cl^- obtidos tivessem sido relativamente elevados (~10 mmol/g peso seco), quando comparados com os níveis de Na^+ (~1 mmol/g peso seco, após os 28 dias). Num estudo efectuado por Walker (1986), foi verificado que a Citranjeira Troyer tinha um

comportamento semelhante ao de *Poncirus trifoliata*, ou seja, possuía a capacidade de excluir parcialmente o Na^+ das folhas, acumulando-o no caule e raízes. Noutro estudo efectuado por Raveh e Levy (2005) em citrinos, foi observado que as árvores enxertadas na C. Troyer, apresentavam índices elevados de Cl^- no xilema, quando comparado com a Cleopatra mandarim. Com o presente trabalho, verificou-se que no porta-enxerto C. Troyer, a concentração de Cl^- foi de facto superior à de Na^+ .

As espécies de citrinos, (assim como outras dicotiledóneas) podem manter elevados níveis de Na^+ e da razão K^+/Na^+ , porque conseguem armazenar a maior parte do Na^+ no vacúolo (Flowers e Yeo, 1988; Glenn *et al.*, 1999). Estas espécies de plantas variam entre si, no que diz respeito à tolerância associada a baixos níveis de Na^+ na parte aérea da planta. Por exemplo, uma espécie selvagem de tomateiro, *Lycopersicon peruvianum*, tolerante à salinidade, acumulou maior quantidade de Na^+ que a espécie doméstica, *L. esculentum*, sensível à salinidade (Tall, 1971; Santa-Cruz *et al.*, 1999).

O efeito do porta-enxerto na concentração de Cl^- nas folhas, poderá estar relacionado com a selectividade no transporte de iões pelas raízes, e/ou efeitos ao nível da condutividade hidráulica nas folhas, que limita a taxa de transpiração e consequentemente limita a acumulação de iões nas folhas (Raveh e Levy, 2005). Face aos dados experimentais obtidos, pode-se inferir que o porta-enxerto Sunki, sendo mais resistente à salinidade, procedeu ao armazenamento de Na^+ tóxico no vacúolo das células nas folhas, e possivelmente à exclusão de Cl^- ao nível da raiz. Enquanto que a Troyer, poderá ter direccionado o Na^+ e também o Cl^- para o caule e raízes, daí não ter ocorrido o aumento da concentração destes iões, neste porta-enxerto.

A determinação de silício (Si) teve como principais objectivos, verificar se as plantas efectuariam o transporte deste elemento ao nível das células, bem como o seu efeito na redução de stresse salino. Existem poucos estudos sobre os efeitos deste elemento em

Citrus, a única fonte de comparação reporta a um estudo efectuado por Wutscher (1989), em que foram utilizadas plântulas de *Citrus sinensis* no porta-enxerto *Citrus limon*. As folhas das plantas que cresceram numa solução contendo 2,4 mM de Si, foram comparadas com as plantas controlo, onde este elemento não foi aplicado. Foi verificado que o Si, tinha “uma função limitada na nutrição dos citrinos”. Contudo, sob condições de stresse salino existe a possibilidade das plantas acumularem este elemento nas células se ele estiver disponível, e que esse facto ajude a ultrapassar os danos provocados pela salinidade. A Sunki foi o porta-enxerto que acumulou mais Si (ver Fig. 26), quando comparado com a Troyer. Neste porta-enxerto, ocorreu uma alteração dos níveis de Na^+ e K^+ , com a aplicação de 3 e 6 dS/m. No entanto, a presença de 2,5 mM de Si, não parece ter afectado o transporte de Na^+ , Cl^- , e K^+ ou mesmo do cálcio (Ca^{2+}) (ver III, 3.1). Pela análise da razão K^+/Na^+ nas folhas das plântulas, verificou-se que este valor foi diminuindo ao longo do tempo, com a aplicação de NaCl, nas concentrações testadas. A presença de 2,5 mM de Si nas soluções, pareceu ter tido influência no valor da razão K^+/Na^+ , uma vez que na presença deste elemento, ocorreu um ligeiro aumento do valor desta razão, especialmente no porta-enxerto Sunki. Assim, parece ocorrer uma resposta celular à presença de Si, na medida em que este elemento possivelmente favorece a entrada de K^+ , em detrimento do Na^+ , para o interior das células.

A prolina é considerada um osmólito sob condições de stresse, e no presente estudo, verificou-se que os seus níveis aumentaram significativamente ($P < 0,05$), particularmente no porta-enxerto Sunki, após os 28 dias de tratamento com a aplicação de 6 dS/m (ver Fig. 32). Também após este período de tempo, foi possível observar que a aplicação de Si, parece ter favorecido a produção deste osmólito, uma vez que foi notório o aumento da sua concentração quando aplicado sem NaCl, ou associado a 3 ou

6 dS/m. No porta-enxerto Troyer, o mesmo não se verificou, inclusivamente não foram detectadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre modalidades e ao longo do tempo. Geralmente nas espécies de citrinos, a prolina tem uma função mínima na regulação do equilíbrio osmótico. De facto, estudos realizados demonstraram uma produção inferior a metade (Nieves *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1993), ou simplesmente não existiu resposta (Syvertsen e Yelenosky, 1988; Lloyd *et al.*, 1989). Neste trabalho, verificou-se que no porta-enxerto Troyer não ocorreu resposta, enquanto que na Sunki, essa resposta ocorreu apenas ao fim de 28 dias, sendo a sua produção de sensivelmente metade, para 6 dS/m (cerca de 56%), e na presença de Si, ligeiramente acima (67%).

Relativamente aos enzimas de stresse oxidativo estudados, verificou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da actividade específica da SOD, em ambos os porta-enxertos, especialmente após os 28 dias de estudo e com o aumento da concentração de NaCl. Relativamente aos enzimas CAT e APX, apenas na Troyer, registou-se um aumento mais acentuado após os 28 dias de tratamento, sendo que em relação à APX essas diferenças foram significativas ($P < 0,05$). A presença de Si, aplicado sem NaCl ou juntamente com o sal (3 e 6 dS/m) (ver III, 3.3), pareceu ter influenciado o aumento significativo ($P < 0,05$) da actividade específica dos enzimas, para ambos os porta-enxertos. Estes resultados poderão indicar a tendência do Si em reduzir os efeitos adversos da salinidade nas plântulas, já que nestes porta-enxertos a presença de Si parece ter desencadeado mecanismos de defesa enzimática. Este tipo de resultados já haviam sido observado noutros estudos utilizando a planta do feijoeiro (*Vigna unguiculata*), onde foi observado o aumento da actividade específica de um enzima de stresse oxidativo, a guaiacol peroxidase (Iwasaki *et al.*, 2002).

É importante referir que a actividade específica dos enzimas SOD, CAT e APX, determinadas para o porta-enxerto Troyer foram cerca de 2, 8 e 10 vezes superiores

quando comparadas com as da Sunki. Este facto poderá indicar que o porta-enxerto Troyer terá o sistema antioxidante mais activo, desencadeando uma maior defesa enzimática. Por outro lado, o facto da actividade específica da CAT e APX não ter aumentado com a salinidade na Sunki, poderá significar que este porta-enxerto teve a capacidade de desencadear mecanismos de defesa celular que visassem proteger as células contra o stresse oxidativo. De entre os mecanismos de defesa poderão incluir-se a acumulação selectiva ou exclusão celular de iões tóxicos, o controlo do transporte de iões ao nível da raiz e transporte para as folhas, ou na compartimentação dos iões nos vacúolos ou na planta. Por outro lado, também poderia estar a ser utilizados mecanismos de defesa não-enzimática, contra ROS formados, não sendo por isso necessário desencadear o sistema enzimático antioxidante. Estes compostos antioxidantes poderiam ser, o α -tocoferol, o ascorbato ou flavonóides, na defesa contra o H_2O_2 formado. Foi proposto que os flavonóides podem ser compostos importantes na desintoxicação de H_2O_2 (Yamasaki, *et al.*, 1997), uma vez que apesar de estarem localizados nos vacúolos, o H_2O_2 difunde-se rapidamente ao longo das membranas. Conclusões semelhantes, foram obtidas por Arbona e colaboradores (2003), onde foi observado que os flavonóides e outros compostos não-polares, contribuíram para evitar danos celulares devido ao stresse oxidativo, sugerindo que o porta-enxerto Citanjeira Carrizo, teve a capacidade de regular mecanismos de defesa enzimática, mas também de regular a síntese de outros compostos.

Os efeitos da salinidade ao nível dos lípidos de membrana, foi verificado pela determinação da concentração de malonaldeído. Foi notório o ligeiro aumento da concentração de MDA em ambos os porta-enxertos, com a aplicação de 6 dS/m, indicando que para o nível de salinidade mais severo, ocorreram danos ao nível dos lípidos da membrana. É de salientar que, na presença de Si, e para a mesma

concentração de NaCl, ocorreu um decréscimo nos níveis de MDA, especialmente na Sunki, indicando uma boa resposta celular, a fim de evitar danos nos lípidos de membrana. Contudo, é de referir que apesar destes resultados, a concentração de MDA foi superior na Troyer (2 vezes) (ver III, 3.4), o que indica que este porta-enxerto quando comparado com a Sunki, apresentou maior quantidade de lípidos danificados pelos ROS, embora a actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo tenha sido superior.

Os efeitos do Si na actividade enzimática, sob condições de stresse salino, estão documentados. Num estudo realizado por Liang (1999) utilizando a planta da cevada, foi demonstrado que a presença de Si na solução salina aumentou a actividade específica da SOD e da CAT, diminuindo a concentração de MDA, indicador de peroxidação de lípidos. Noutro estudo utilizando a planta do tomateiro, Al-aghabary e colaboradores (2004) verificaram um aumento da actividade específica da SOD, CAT e APX e uma diminuição dos níveis de MDA, na presença de Si.

De uma maneira geral, a resposta ao stresse salino foi mais favorável no porta-enxerto Sunki, comparativamente ao porta-enxerto Troyer. Os níveis de Na^+ nas folhas de Sunki foram aumentando ao longo do tempo e para as diferentes modalidades. No entanto, a concentração de K^+ após os 28 dias foi superior, assim como o valor da razão Na^+/K^+ , sendo indicativo que este porta-enxerto poderia estar a compartimentar o Na^+ , e por isso a tolerar o stresse salino a que foi submetido. O valor da razão Na^+/K^+ no porta-enxerto Troyer no tempo 0, foi de aproximadamente 0,5, por outro lado, no porta-enxerto Sunki só após os 14 dias de aplicação de stresse salino o valor da razão Na^+/K^+ foi inferior a 1. Também neste porta-enxerto, os níveis de prolina foram relativamente superiores e os níveis de MDA inferiores, após os 28 dias de estudo, para a concentração mais elevada de NaCl.

A resposta ao Si também foi mais favorável na Sunki, uma vez que neste porta-enxerto a concentração deste elemento foi superior. Também verificou-se que este elemento aumentou a actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo e diminuiu os níveis de MDA.

Foi possível observar diferenças ao nível da acumulação de Si por parte das plântulas de porta-enxertos e discos de folhas de cultivares. Verificou-se que aplicando Si como suplemento às plântulas, no caso concreto da Sunki, ocorreu o transporte do ião e parece que em alguns aspectos ajudou a ultrapassar o stresse oxidativo, pelo aumento da actividade específica dos enzimas SOD, CAT e APX.

O valor da concentração de NaCl testada (6 dS/m), pareceu ter sido suficientemente tóxica para as plântulas, mas não ao nível dos discos de folha. Quando aplicada esta concentração de NaCl às plântulas, verificou-se que os níveis de K^+ diminuíram relativamente ao longo do tempo, e a actividade específica dos enzimas de stresse oxidativo aumentou, demonstrando que as células estariam sob stresse e que os mecanismos de defesa enzimática foram desencadeados. Contudo, nos ensaios com discos de folhas, esta situação não se verificou e embora a concentração de Na^+ tenha aumentado, a de K^+ manteve-se relativamente constante, assim como a de todos os outros parâmetros analisados (prolina, enzimas de stresse oxidativo e MDA), indicando que este poderia estar a ser acumulado nos vacúolos, a fim de evitar danos celulares, ou que as células poderiam estar a excluir os iões tóxicos.

Por outro lado, a aplicação de Si, quer na água de rega das plântulas de porta-enxertos, quer nas soluções de incubação dos discos de folhas pareceu ter influenciado a actividade específica dos enzimas antioxidantes, uma vez que a actividade específica aumentou.

Estudos recentes indicaram a existência de proteínas, responsáveis pelo transporte de silício para o interior das células, nomeadamente na planta do arroz e ao nível da raiz (Ma, *et al.* 2004), o que ajudou a compreender o tipo de transportador associado ao Si. Mitani e Ma (2005) verificaram que, na planta do arroz o transporte de silício é efectuado por um transportador específico, e no tomateiro e pepino por difusão passiva. No entanto, os mecanismos bioquímicos do silício associados à redução do transporte de Na⁺ nas células, são ainda desconhecidas.

V. Conclusões

Os porta-enxertos diferem entre si na capacidade de restringir a absorção e/ou transporte de Cl^- e Na^+ , quando submetidos a stresse salino. O solo com elevada concentração de sal é aparentemente seco, uma vez que a água disponível fica retida entre os iões. Uma das respostas primárias utilizadas pelos citrinos, consiste na produção de um osmólito compatível, como a prolina, e pela absorção de iões que diminuem ao potencial hídrico no tecido foliar e possibilitam a manutenção do fluxo de água ao longo do xilema. Relativamente aos porta-enxertos estudados, conclui-se que em termos gerais de resposta à salinidade, aparentemente a T. Sunki terá melhor resistência, comparativamente com a C. Troyer, possivelmente devido a uma maior acumulação da prolina, como estratégia celular primária de resposta à salinidade. O menor nível de peroxidação de lípidos observado na T. Sunki, vem evidenciar a sua maior capacidade de resistência à salinidade. Também neste porta-enxerto parece ter ocorrido uma resposta favorável à presença de silício, para ultrapassar as condições de stresse salino. Aparentemente, este elemento favorece o transporte de K^+ para o interior das células, a actividade dos enzimas de stresse oxidativo, os níveis de prolina, e a diminuição dos níveis de peroxidação de lípidos de membrana. Portanto, torna-se evidente o contributo do silício, para fazer face às condições adversas de salinidade nas plantas.

No ensaio *in vivo*, utilizando as cultivares ‘Valencia late’ e ‘Nova’ enxertadas na Citranjeira Carrizo e *Citrus macrophylla*, verificou-se que a concentração de sal mais elevada, testada na água de rega (6 dS/m), conduziu a um aumento da concentração dos iões Na^+ e Cl^- intracelulares, e a uma subsequente diminuição dos níveis de K^+ intracelular. Apesar da diminuição dos níveis de K^+ a cultivar ‘Valencia late’ manteve o índice K^+/Na^+ acima dos da cultivar ‘Nova’, independentemente do porta-enxerto, sugerindo uma estratégia celular de exclusão do Na^+ .

O sistema enzimático avaliado, não sugeriu uma resposta bioquímica, quer no ensaio *in vivo* quer no ensaio *in vitro*. Contudo, no ensaio *in vitro* o índice K^+/Na^+ foi ligeiramente inferior na ‘Valencia late’ em relação à ‘Nova’, o que pode ser atribuído ao diferente comportamento do porta-enxerto, que foi diferente em ambos os ensaios.

Na cultivar ‘Valencia late’ verificou-se actividade oxidativa, através do aumento da peroxidação dos lípidos de membrana, tendo esta cultivar sido mais afectada comparativamente à cultivar ‘Nova’.

VI. Perspectivas Futuras

As estratégias utilizadas pelas plantas para superar o stresse osmótico e oxidativo, provocados pela salinidade, variam de espécie para espécie e dentro da mesma espécie. Compreender os mecanismos bioquímicos associados à tolerância/resistência à salinidade é importante para que se possa seleccionar as plantas mais adequadas a desenvolverem-se num determinado tipo de solo. Também é importante compreender a função de alguns compostos, como o silício, na redução do stresse salino para que de futuro estes possam ser utilizados na água de rega das plantas.

Por forma a completar este trabalho, seria interessante avaliar nas cultivares e porta-enxertos estudados, qual o ião tóxico (Na^+ ou Cl^-) e as estratégias celulares e/ou fisiológicas de resposta à salinidade, em concentrações moderadas e elevadas (a exclusão dos iões ao nível da raiz, o controlo do movimento dos iões, a capacidade de compartimentar iões).

Completar o estudo do sistema antioxidante, enzimático e não-enzimático e comparar a resposta a este nível para níveis moderados de sal. O ciclo da glutathione, mas também a determinação de compostos antioxidantes como polifenóis, β -caroteno, ácido ascórbico ou glutathione.

Uma análise mais profunda ao nível molecular, deveria ser contemplada como sendo a identificação de marcadores moleculares, nomeadamente de um gene ou proteína (osmótina ou dehidrina), que sejam expressos sob condições de salinidade nas plantas.

VII. Referências Bibliográficas

- Abrol, I.P., Yadov, J.S.P., Massoud, F.I. (1998). Salt-affected soils and their management. Soil Resources, Mgmt. and Conservation Ser., FAO Land and Water Dev. Div. Bul. 39.
- Al-aghabary, K., Zhu, Z., Shi, Q. (2004). Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. *J. Plant Nutr.* 27(12): 2101-2115.
- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N. (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* 123: 1047-1056.
- Allen, R.D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107: 1049-1054.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. *Physiol. Plant* 100: 224-233.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exper. Bota.* 53(372): 1331-1341.
- Alsup, C.M. (1998). Salinity: Causes and effects, and management practices. Planthugger Territory. Consultado a 6 de Outubro de 2003, em Southwest Missouri State University:
<http://www.faculty.smsu.edu/c/cma545f/Salinity.htm>
- Al-Yassin, A. (2004). Influence of salinity in citrus: a review paper. *J. Central European Agriculture.* 5(4): 263-272.
- Amtmann A., Sanders, D. (1999). Mechanisms of Na⁺ uptake in plant cell. *Adv. Bot. Res.* 29:75-112.
- Apse, M.P., Blumwald, E. (2002). Engineering salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotech.* 13: 146-150.
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P., Gómez-Cadenas, A. (2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of *Carrizo citrange*, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant cell Physiol.* 44(4): 388-394.
- Arrigoni, O., De Tulio, M.C. (2000). The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *J. Plant Physiol.* 157: 481-488.

- Asada K. (1992). Production and scavenging of active oxygen species in chloroplasts. In: Scandalios, J. G. (ed.). *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 173-192.
- Asada, K., Takahashi, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J. *et al.* (eds). *Photoinhibition*. Elsevier, pp 227-287.
- Avsian-Kretchmer, O., Eshdat, Y., Gueta-Dahan, Y., Ben-Hayyim, G. (1999). Regulation of stress induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in *Citrus*. *Planta* 209: 469-477.
- Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., Abreu, C. E. B., Gomes-Filho, E. (2005). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environ. Exp. Bot. In press*.
- Aziz, A., Tanguy-Martin, J., Larher, F. (1999). Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Sci.*, 145: 83-91.
- Ball, M.C., Chow, W.S., Anderson, J.M., (1987). Salinity-induced potassium deficiency cause loss of functional photosystem II in leaves of the grey mangrove, *Avicennia marina*, through depletion of the atrazine-binding polypeptide. *Aust. J. Plant. Physiol.* 14: 351-361.
- Bañuls, J., Primo-Millo, E. (1992). Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of *Citrus* plants. *Physiol. Plant.* 86:115-123.
- Bañuls, J., Primo-Millo, E. (1995). Effects of salinity on some citrus scion-rootstock combinations. *Anna. Botan.* 76: 97-102.
- Bañuls, J., Serna, M.D., Legaz, M., Primo-Millo, E. (1997). Growth and gas exchange of *Citrus* plants stressed with different salts. *J. Plant Physiol.* 150:194-199.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Beilby, M.J., Walker, N.A. (1981). Chloride transport in *Chara*. I. Kinetics and current-voltage curves for a probable proton symport. *J. Exp. Bot.* 32: 43-54.
- Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W., Wayner, D. D. M. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology Medicine* 2: 419-444.

- Benz, R., Cros, D. (1978). Influence of sterols on ion transport through lipid bilayer membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 506: 265-280.
- Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49: 3-8.
- Beyer, W.F., Fridovich, I. (1987). Assay of superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
- Bhandal, I.S., Malik, C.P. (1988). Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *Inter. Review of Cytology*. 110: 205-254.
- Bhushan, A., McNamee, M.G. (1993). Correlation of phospholipid structure with functional effects on the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 64: 716-723.
- Binzel, M.L., Hess, D., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1988). Intracellular compartmentation of ions in salt-adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86: 607-614.
- Blaha, G., Stelzl, U., Spahn, C.M.T., Agrawal, R.K., Frank, J., Nierhaus, K.H. (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods in Enzymology*. 317: 292-309.
- Blokhina, O. (2000). Anoxia and Oxidative Stress: Lipid Peroxidation, Antioxidant Status and Mitochondrial Functions in Plants. *Dissertação Acadêmica, Universidade de Helsinquia, Finlândia.*
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Anna. Botan.* 91: 179-194.
- Blumwald, E. (1987). Tonoplast vesicles for the study of ion transport in plant vacuoles. *Physiol. Plant* 69: 731-734.
- Blumwald, E., Aharaon, G.S., Apse, M.P. (2000). Sodium Transport in plant cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1465: 140-151.
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14: 89-97.
- Bohnert, H.J., Shen, B. (1999). Transformation and compatible solutes. *Sci. Hort.* 78:237-260.
- Bongi, G., Loreto, F. (1989). Gas exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiol.* 90: 1408-1416.

- Bor, M., Ozdemir, F., Turkan, I. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidant in leaves of sugar *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Sci.* 164: 77-84.
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M., Inzé, D. (1991). Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* 10:1723-1732.
- Boylston, E.K., Hebert, J.J., Hensarling, T.P., Bradow, J.M., Thibodeaux, D.P. (1990). Role of silicon in developing cotton fibers. *J. Plant Nutr.* 13: 131-48.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M. (1998). Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends Plant Sci.* 3(11): 411-412.
- Briens, M., Larher, F. (1982). Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant Cell Environ.* 5: 287-292.
- Brown, D.J., DuPont, F.M. (1989). Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from roots of barley (*Hordeum vulgare* L). Effects of salt. *Plant Physiol.* 90: 955-961.
- Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 535-543.
- Carruthers, A., Melchior, D.L. (1986). How bilayer lipids affect membrane protein activity. *TIBS* 11: 331-335.
- Cerdá, A., Caro, M., Fernández, F.G., Guillén, M.G. (1977). Foliar contents of sodium and chloride on citrus rootstocks irrigated with saline waters. In: Dregne, H.E. (ed.). *Managing Saline Water for Irrigation. Proc. Int. Salinity Conf.*, Texas Tech Univ., Lubbock, TX, pp 155-164.
- Cerdá, A., Pardines, J., Botella, M.A., Martínez, V. (1995). Effect of potassium on growth, water relations, and the inorganic and organic solute contents for two maize cultivares grown under saline conditions. *J. Plant Nutr.* 18: 839-851.

- Cerezo, M., GarciaAgustin, P., Serna, M.D., Primo-Millo, E. (1997). Kinetics of nitrate uptake by *Citrus* seedlings and inhibitory effects of salinity. *Plant Sci.* 126: 105-112.
- Chance, B., Maehly, A.C. (1955). Assay of catalase and peroxidase, In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (eds.). *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp.764-775.
- Chang, H.M., Reitstetter, R., Mason, R.P., Gruener, R. (1995). Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: an interpretation using structural stress as a unifying concept. *J. Membr. Biol.* 143: 51-63.
- Chaudière, J., Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 949-962.
- Chen, G.X., Asada, K. (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and their differences in enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* 30: 987-998.
- Cooke, D.T., Burden, R.S. (1990). Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. *Physiol. Plant.* 78: 153-159.
- Cram, W.J. (1973). Chloride fluxes in cells of the isolated root cortex of *Zea mays*. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 757-779.
- Cramer, G.R., Läuchli, A., Polito, V.S. (1985). Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. *Plant Physiol.* 79: 207-211.
- Davies, M.J. (2004). Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical and Photobiological Sciences* 3: 17-25.
- De Grier, J., Mandersloot, J.G., Van Deenen, L.L.M. (1968). Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 150: 666-675.
- Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid method for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic. Biol. Med.* 15: 353-63.
- Douglas, T.J., Walker, R.R. (1984). Phospholipids, free sterols and adenosine triphosphatase of plasma membrane-enriched preparations from roots of citrus genotypes differing in chloride exclusion ability. *Physiol. Plant.* 62: 51-58.
- Downton, W.J.S. (1977). Photosynthesis in salt stressed grapevines. *Aust. J. Plant Physiol.* 4: 183-192.

- Dubcovsky, J., Maria, G.S., Epstein, E., Luo, M.C., Dvorak, J. (1996). Mapping of the K^+/Na^+ discrimination locus *kn1l* in wheat. *Theoretical and Applied genetics* 92: 448-454.
- Elstner, E.F. (1991). Mechanism of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Pell, E. J., Steffen, K. L. (ed.). *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. pp. 13-25.
- Epstein, E. (1994). The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 1-17.
- Epstein, E. (1999). Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 641-640.
- Erturk, H.N. (1999). Responses of Superoxide Dismutases to Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana*. Tese de Doutorado, Faculdade do Instituto Politécnico da Virginia. Blacksburg, Virginia. pp 2-3, 35-36.
- FAO/Unesco – Extent and causes of salt-affected soils in participating countries. Consultado a 28 Abril de 2005.
<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm>
- Fahrenholz, S.R., Doleiden, F.H., Tozzolo, A.M., Lamola, A.A. (1974). On the quenching of singlet oxygen by α -tocopherol. *Photochem Photobiol* 20: 505-9.
- Felle, H.H. (1994). The H^+/Cl^- symporter in root-hair cells of *Sinapis alba*. An electrophysiological study using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol.* 106: 1131-1136.
- Fernandez-Ballester, G., Martinez, V., Ruiz, D., Cerdá, A. (1998). Changes in inorganic and organic solutes in Citrus under saline stress. *J. Plant Nutr.* 21(12): 2497-2514.
- Ferreira, A.L (2005). Caracterização cinética da cultura de células em suspensão de *Citrus* sp. L. resposta bioquímica ao stresse salino. Dissertação académica PhD. Universidade do Algarve, Portugal.
- Flowers, T.J., Yeo, A.R. (1988). Ions relation of salt tolerance. In: Baker D., Walls, J. (eds). *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*. Harlow: Longman. pp 392-416.
- Flowers, T.J., Flowers, S.A. (2005). Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agricultural Water Management: in press*.

- Flowers, T.J., Troke, P.F., Yeo, A.R. (1977). The mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28: 89-121.
- Foreman, J., Demidchik V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brolonlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M., Dolan, L. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 27: 442-446.
- Foyer, C.H., Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Foyer, C.H., Lelandais, M.A. (1996). A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylacoids, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaves mesophyll cells. *J.Plant Physiol.* 148: 391-398.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell Envir.* 28: 1056-1071.
- Frenkel, C. (1991). Disruption of macromolecular hydration-a possible origin of chilling destabilisation of biopolymers. *Trends Food Sci. Tech.* 2: 39-41.
- Gérard-Monnier D., Chaudière J. (1996). Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion. *Pathological Biology* 44: 77-85.
- Gerson, D.F, Poole, R.J. (1972). Chloride accumulation by mung bean root tip. *Plant Physiol.* 50: 603-607.
- Gibberd, M.R., Walker, R.R., Condon, G.A. (2003). Whole-plant transpiration efficiency of Sultan grapevine grown under saline conditions in increased through the use of Cl-excluding rootstock. *Funct. Plant Biol.* 30: 643-652.
- Girotti, A.W., Kriska, T. (2004). Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxidants and Redox Signaling* 6: 301-310.
- Glenn, E.P, Brown, J.J., Blumwald, E. (1999). Salt tolerance and crop potencial of halophytes. *Critical Review in Plant Sci.* 18: 227-255.
- Goméz-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talon, M. (1998). Involvement of abscisic acid and ethylene in the response of citrus seedlings to salt shock. *Physiol. Plant.* 103: 475-484.
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S., Zhang, C. (2005). Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Sci.* 169: 313-321.

- Gorham, J., Wyn Jones, R.G., McDonnell, E. (1985). Some mechanisms of salt tolerance in crops plants, *Plant Soil*. 89: 15-40.
- Grabov, A., Leung, J., Giraudat, J., Blatt, M.R. (1997). Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J*. 12: 203-213.
- Grattan, S.R., Grieve, C.M. (1992). Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agric. Ecosys. Environ*. 38: 275-300.
- Green M.A., Fry S.C. (2005). Degradation of vitamin C in plant cells via enzymic hydrolysis of 4-*O*-oxalyl-1-threonate. *Nature* 433: 83-87.
- Greenway, H., Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 31: 149-190.
- Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B.A., Ben-Hayyim, G. (1997). Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta* 203: 460-469.
- Hagemann, M., Erdmann, N. (1997). Environmental stresses. In: Rai, A.K. (ed.). *Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology*. Springer, Heidelberg, Narosa Publishing House. New Delhi, India. pp. 165-221.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, cell Envir*. 21: 535-553.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 51: 463-499.
- Hawkesford, M.J., Davidian, J.C., Grignon, C. (1993). Sulphate/proton cotransport in plasmamembrane vesicles isolated from roots of *Brassica napus* L.: Increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* 190: 297-304.
- Hayashi, H., Murata, N. (1998). Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. In: Sato, K., Murata, N. (ed.). *Stress Response of Photosynthetic Organisms: Molecular Mechanisms and Molecular Regulation*. Elsevier. Amsterdam, pp. 133-148.
- Health Canada – Official Methods (1999). Determination of whole tobacco pH. Consultado a 15 Janeiro de 2004.
<http://www.hc-sc.gc.ca/hesc-sesc/tobacco/pdf/T-310e4.PDF>.

- Hernandez, J. A., Olmos, E., Corpaz, F. J., Sevilla, F., del Rio, L. A. (1995). Salt induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* 105: 151-167.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604-611.
- Hodson, M.J., Sangster, A.G. (1990). Techniques for the microanalysis of higher plants, with particular reference to silicon in cryofixed wheat tissues. *Scanning Microscopy*. 4: 407-418.
- Horemans, N., Foyer, C.H., Potters, G., Asard, H. (2000). Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 531-540.
- Imlay, J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 395-418.
- INE- Agricultura, produção animal, silvicultura e pescas. CENSOS 2002.
- Iwasaki, K., Maier, p., Fecht, M., Horst, W.J. (2002). Leaf aploplastic silicon enhances manganese tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata*). *J. Plant Physiol.* 159: 167-173.
- Jones, L.H.P., Handreck, K.A. (1965). Studies of silica in the oat plant. III. Uptake of silica from soils by plant. *Plant Soil* 23: 79-95.
- Kaile, A. (1997). Cholesterol-modulated ion channel activity in tonoplast vesicles: A planar lipid bilayer study. *J. Exp. Bot.* 48: 979-983.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.
- Kauss, H., Seehaus, K., Franke, R., Gilbert, S., Dietrich, R.A., Kröger, N. (2003). Silica deposition by strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants. *Plant J.* 33: 87-95.
- Kerkeb, L., Donaire, J.P., RodriguezRosales, M.P. (2001). Plasma membrane H^+ -ATPase activity is involved in adaptation to tomato calli to NaCl. *Physiol. Plant.* 111: 483-490.
- Kim, J., Chehade, J., Pinnas, J.L., Mooradian, A.D. (2000). Effect of select antioxidants on malondialdeyde modification of proteins. *Nutrition* 16: 1079-81.
- Kingsbury, R.W., Epstein, E. (1986). Salt sensitivity in wheat - A case for specific ion toxicity. *Plant Physiol.* 80: 651-654.

- Kozłowski, T.T. (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiol.* 1: 1-29.
- Larher, F.R., Aziz, A., Gibon, Y., Trotel-Aziz, P., Sulpice, R., Bouchereau, A. (2003). An assessment of the physiological properties of the so-called compatible solutes using in vitro experiments with leaf discs. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 657-666.
- Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27: 969-978.
- Ledford, H.K., Niyogi, K.K. (2005). Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell Envir.* 28: 1037-1045.
- Lee, S., Iwata, T., Oyagi, H., Aoyagi, H., Ohno, M., Anzai, K., Kirino, Y., Sugihara, G. (1993). Effect of salts on conformational change of basic amphipathic peptides from β -structure to α -helix in the presence of phospholipid liposomes and their channel-forming ability. *Biochem. Biophys. Acta* 1151: 76-82.
- Liang, Y. (1999). Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. *Plant and Soil* 209: 217-224.
- Liang, Y., Chen, Q., Liu, Q., Zhang W., Ding R. (2003). Exogenous silicon (si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.* 160: 1157-1164.
- Liang, Y.C. (1998). Effects of silicon on leaf ultrastructure, chlorophyll content and photosynthetic activity in barley under salt stress. *Pedosphere* 8: 289-296.
- Liang, Y.C., Shen, Q.R., Shen, Z.G., Ma, T.S. (1996). Effects of silicon on salinity tolerance of two barley cultivars. *J. Plant Nutr.* 19: 173-183.
- Lloyd, J., Kriedemann, P.E., Aspinall, D. (1989). Comparative sensitivity of "Prior Lisbon" lemon and "Valencia" orange trees to foliar sodium and chloride concentrations. *Plant Cell Environ.* 12: 529-540.
- Lloyd, J., Kriedemann, P.E., Aspinall, D. (1990). Contrasts between Citrus species in response to salinization: An analysis of photosynthesis and water relations for different rootstock-scion combinations. *Physiol. Plant.* 78: 236-246.
- Lobo-Ferreira, J.P., Oliveira, M.M., Moinante, M.J., Theves, T., Diamantino, C. (1995). Avaliação da vulnerabilidade da captação de recepção das águas e zonas costeiras, meios receptores e suas características: Meios subterrâneos – mapeamento das águas subterrâneas da faixa costeira litoral e da vulnerabilidade doas seus aquíferos à poluição. Relatório específico R3.3. Lisboa, LNEC,

- Relatório 237-GIAS, pp 585. Consultado a 28 de Abril de 2005, em Laboratório Nacional de Engenharia Civil:
<http://www.dha.lnec.pt/nas/estudos/ihrh.html>.
- Loreto, F., Centritto, M., Chartzoulakis, K. (2003). Photosynthetic limitations in olive cultivares with different sensitivity to salt stress. *Plant Cell Environ.* 26: 595-601.
- Ma, J.F., Mitani, N., Nagao, S., Konishi, S., Tamai, K., Iwashita, T., Yano, M. (2004). Characterization of the silicon uptake system and molecular mapping of the silicon transporter gene in rice. *Plant Physiol.* 136: 3284-3289.
- Maas, E.V. (1990). Crop Salt tolerance. In: Tnaji, K.K. (ed.). *Agriculture Salinity Assessment and Management*. Am. Soc. Civil Eng. Manuals and Reports on Engineering N° 7, New York, pp 202-304.
- Maas, E.V. (1993). Salinity and citriculture. *Tree Physiol.* 12(2): 195-216.
- Maathuis, F.J.M., Amtmann, A. (1999). K^+ nutrition and Na^+ toxicity: The basis of cellular K^+/Na^+ ratios. *Anna. Botan.* 84: 123-133.
- Mansour, M.M.F., van Hasselt, P.R., Kuiper, P.J.C. (1994). Plasma membrane lipid alterations induced by NaCl in winter wheat roots. *Physiol. Plant* 92: 473-478.
- Mansour, M.M. F., Salama, K.H.A., Al-Mutawa, M.M. (2003). Transport proteins and salt tolerance in plants. *Plant Sci.* 164: 891-900.
- Marschner, H. (1995). Beneficial mineral elements. In: *Mineral Nutrition of Higher Plants*. (3ª ed.), Academic Press, London. pp. 405-426.
- Marschner, H., Obeler, H., Cakmak, I., Römheld, V. (1990). Growth enhancement by silicon in cucumber (*Cucumis sativus*) plants depends on imbalance on phosphorous and zinc supply. In: Van Beusichem, M.L. (ed.). *Plant Nutrition-Physiology and Applications*, Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 241-249.
- Martinez, G.R., Loureiro, A.P., Marques, S.A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L.F., Onuki, J., Almeida, E.A., Garcia, C.C.M., Barbosa, L.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. (2003). Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutation Research* 544: 115-127.
- Matoh, T., Kairusmee, P., Takahashi, E. (1986). Salt-induced damage to rice plants and alleviation effect of silicate. *Soil Sci. Plant Nutr.* 32: 295-304.

- McClure, P.R., Kochian, L.V., Spanswick, R.M., Shaff, J.E. (1990). Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots, I. Effects of nitrate on the membrane potential, *Plant Physiol.* 93: 281-289.
- McCue, K.F., Hanson, A.D. (1990). Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Trends Biotech.* 8: 358-362.
- McKee, T., McKee, J.R. (2003). Aerobic metabolism II: Electron transport and oxidative phosphorylation. In: *Biochemistry-The Molecular Basis of Life*, (3rd ed.) McGraw-Hill, pp 298-330.
- McKersie, B.D., Leshem, Y.Y. (1994). *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Kluwer Academic Publishes, Dordrecht.
- Miller, A.J., Smith, S.J. (1996). Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *J. Exp. Bot.* 47: 843-854.
- Mitani, N., Ma, J.F. (2005). Uptake system of silicon in different plant species. *J. Expe. Botany* 56(414): 1255-1261.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9): 405-410.
- Miyake, C., Michihata, F., Asada, K. (1991). Scavenging of hydrogen peroxide in prokaryotic and eukaryotic algae: acquisition of ascorbate peroxidase during the evolution of cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 32: 33-43.
- Moya, J.L., Primo-Millo, E., Talon, M. (1999). Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant, cell Envir.* 22: 1425-1433.
- Moya, J.L., Gómez-Canedas, A., Primo-Millo, E., Talon, M. (2003). Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstock is linked to water use. *J. Experim. Bota.* 54(383): 825-833.
- Müller, M., Santarius, K.A. (1978). Changes in chloroplast membrane lipids during adaptation of barley to extreme salinity. *Plant Physiol.* 62: 326-329.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns R., Guo J., Passioura, J.B., Cramer, G.R. (2000). Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Austr J. Plant Physiol.* 27: 949-957.

- Munné-Bosch, S. (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162: 743-748.
- Nakano, Y., Asada, K., (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Nelsen, P.V. (1991). *Greenhouse operation and management.* (4^a ed.) Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Neyses, L., Locher, R., Stimpel, M., Streuli, R., Vetter, W. (1985). Stereospecific modulation of the calcium channel in human erythrocytes by cholesterol and its oxidized derivatives. *Biochem. J.* 227: 105-112.
- Nieves, M., Cerdá, A., Botella, M. (1991). Salt tolerance of two lemon scions measured by leaf chloride and sodium accumulation. *J. Plant Nutr.* 14: 623-636.
- Nieves, M., Ruiz, D., Cerdá, A. (1992). Influence of rootstock-scion combination in lemon trees salt tolerance. In: *Proc. Int. Soc. Citriculture, Acireale, Italy*, pp. 387-390.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 109: 735-742.
- Niu, X., Damsz, B., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1996). NaCl-induced alterations in both cell structure and tissue-specific plasma membrane H⁺-ATPase gene expression. *Plant Physiol.* 111: 679-686.
- Noctor, G., Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- Orcutt, D.M., Nilsen, E.T. (2000). Salinity stress. In: *Physiology of Plants Under Stress- Soil and Biotic Factors.* (ed). John Wiley & Sons, Canada, pp.177-235.
- Paranychanakis, N.V., Chartzoulakis, K.S. (2005). Irrigation of Mediterranean crops with saline water: from physiology to management practices. *Agric. Ecosys. Enviro.* 106: 171-187.
- Parida, A.K., Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology Environmental Safety* 60: 324-349.
- Pignocchi C., Foyer, C.H. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 379-389.
- Pignocchi C., Fletcher, J.M., Wilkinson, J.E., Barnes, J.D., Foyer, C.H. (2003). The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiol.* 132: 1631-1641.

- Pollard, A., Wyn, J.W.G. (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta* 144: 291–298.
- Polle, A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modelling, computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126: 445-462.
- Poovaiah, B.W., Reddy, A.S.N. (1993). Calcium and signal transduction in plants, *Crot. Rev. Plant Sci.* 12: 185-211.
- Prior, L.D., Grieve, A.M., Slavish, P.G., Gullis, P.R. (1992). Sodium and chloride and soil texture interactions in irrigated field grown Sultana grapevines. II. Plant mineral content, growth and physiology. *Aust. J. Agric. Res.* 43: 1067-1084.
- Raggi, M.A., Sabbioni, C., Mandrioli, R., Zini, Q., Varani, G. (1999). Spectrophotometric determination of silicate traces in hemodialysis solutions. *J. Pharm. Biome. Anal.* 20: 335-342.
- Rathinasabapathi, B. (2000). Metabolic engineering of stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Ann. Bot.* 86: 709–716.
- Raveh, E. (2005). Methods to assess potencial chloride stress in citrus: analysis of leaves, fruit, steam-xylem sap, and roots. *HortTechnology* 15(1): 17-21.
- Raveh, E., Levy, Y. (2005). Analysis of xylem water as an indicator of current chloride uptake status in citrus trees. *Sci. Agric.* 103: 317-327.
- Raven, J.A. (1983). The transport and function of silicon in plants. *Biol. Rev.* 58: 179-207.
- Rengel, Z. (1992). The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ.* 15: 625–632.
- Romero-Aranda, R., Moya, J.L., Tadeo, F.R., Legaz, F., Primo-Millo, E., Talon, M. (1998). Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant Cell Environ.* 21: 1243-1253.
- Ruiz, D., Martinez, V., Cerdá, A. (1997). Citrus response to salinity: growth and nutrition uptake. *Tree Physiol.* 17: 141-150.
- Ruiz, D., Martinez, V., Cerdá, A. (1999). Demarcating specific ion (NaCl, Cl⁻, Na⁺) and osmotic effects in the response of two citrus rootstocks to salinity. *Sci. Hort.* 80: 213-224.

- Ruiz-Cristin, J., Briskin, D.P., (1991). Characterization of a H^+/NO_3^- symport associated with plasma membrane vesicles of maize roots using $^{36}ClO_3^-$ as a radiotracer analog. *Arch. Biochem. Biophys.* 285: 74-82.
- Sairam, R.K., Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86(3): 407-421.
- Sangster, A.G., Hodson, M.J. (1992). Silica in higher plants. *CIBA Found. Symp.* 121: 90-107.
- Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A., Bolarin, M.C. (1999). Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 65-71.
- Savant, N.K., Korndörfer, G.H., Datnoff, L.E., Snyder, G.H. (1999). Silicon nutrition and sugarcane production: A review. *J. Plant Nutr.* 22(12): 1853-1903.
- Schachtman, D., Liu, W. (1999). Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends in Plant Sci.* 4(7): 281-287.
- Schonbaum, G.R., Chance, B. (1976). Catalase. In: Boyer, P. D. (Ed.). *The Enzymes*. Vol. XIII, New York Academy, pp. 363-408.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., Allen, G.J. (2001a). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410: 327-330.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., Waner, D. (2001b). Guard cell signal transduction. *Annu. Review of Plant Physiol. And Mol. Biol.* 52: 627-658.
- Serbinova, E.A., Packer, L. (1994). Antioxidant properties of α -tocopherol and α -tocotrienol. *Methods in Enzymology* 234: 354-366.
- Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165: 1-52.
- Serrano, R., Rodriguez, P.L. (2002). Plants, genes and ions. Workshop on the molecular basis of ionic homeostasis and salt tolerance in plants, Madrid, Spain, European Molecular Biology Organization.
- Simmonds, A.C., East, J.M., Jones, O.T., Rooney, E.K., McWhirter, J., Lee, A.G. (1982). Annular and non-annular binding sites on the $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ ATPase. *Biochem. Biophys. Acta* 693: 398-404.

- Singh, S.C., Sinha, R.P., Hader, D.P. (2002). Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozool.* 41: 297-308.
- Skerrett, M., Tyerman, S.D. (1994). A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. *Planta* 192: 295-305.
- Smirnoff, N. (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals Bot.* 78: 661-660.
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and function of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 229-235.
- Spiegel-Roy, P., Goldschmidt, E.E. (1996). Aspects of cultivated citrus. In: *Biology of Citrus*, (ed.). Cambridge University Press, New York, pp. 136-146.
- Stavarek, S.J., Rains, D.W. (1985). Effect of salinity on growth and maintenance costs of plant cells. In: Key, J.L., Kosuge, T. (eds.). *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. Alan R. Liss, New York, pp. 161-185.
- Storey, R., Walker, R.R. (1987). Some effects of root anatomy on K, Na, Cl loading of citrus roots and leaves. *J. Exp. Bot.* 38: 1769-1780.
- Storey, R., Walker, R.R. (1999). Citrus and Salinity. *Scient.Hort.* 78: 39-81.
- Syvertsen, J.P., Yelenosky, G. (1988). Salinity can enhance freeze tolerance of citrus rootstock seedlings by modifying growth, water relations, and mineral nutrition. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 113: 889-893.
- Taiz, L., Zaiger, E. (2002). Salt Stress. HORT 301-Plant Physiology. Consultado a 29 Abril 2004, em University of Purdue:
<http://www.hort.purdue.edu/hort/courses/HORT301/MikesLectures/SaltStress.html>.
- Takahashi, E., Miyake, Y. (1977). Silica in plant growth. *Proc. Int. Semin. Soil Environ. Fertil. Manage. Intensive Agric.*, pp. 603-611.
- Tall, M. (1971). Salt tolerance in wild relatives of the cultivated tomato: responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* e *L. esculentum minor* to sodium chloride solution. *Aust. J. Agric. Research* 24: 353-361.
- Taylor, C.B. (1996). Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. *The Plant Cell.* 8: 1221-1224.
- Tester, M., Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Anna. Botan.* 91(5): 503-527.

- Thomas, C.E., McLean, L.R., Parker, R.A., Ohlweiler, D.F. (1992). Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids* 27: 543-550.
- Tyerman, S.D., Skerrett, I.M. (1999). Root ion channels and salinity. *Sci. Agric.* 78: 175-235.
- Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R., Thomas, G. (2003). Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.)-diferential responses in salt-tolerant and sensitive varieties. *Plant Sci.* 165: 1411-1418.
- Van Volkenburgh, E., Boyer, J.S. (1985). Inhibitory effects of water deficit on maize leaf elongation. *Plant Physiol.* 77: 190-194.
- Viegas, W.S., Cecílio, L.M. (1998). Constituição química, estrutura e função das membranas biológicas. In: *Biologia Vegetal*. (ed.) Universidade Aberta. pp. 57-63.
- Walker, R.R. (1986). Sodium exclusion and potassium-sodium selectivity in salt-treated trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) and Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata*) plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 293-303.
- Walker, R.R., Douglas, T.J. (1983). Effect of salinity level on uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in citrus plants. *Aust. J. Agric. Res.* 34: 145-153.
- Walker, R.R., Törökfalvy, E., Downton, W.J.S. (1982). Photosynthetic responses of the *Citrus* varieties of Rangpur lime and Etrog citron to salt treatment. *Aus. J. Plant Physiol.* 9: 783-790.
- Walker, R.R., Blackmore, D.H., Sun, Q. (1993). Carbon dioxide assimilation and foliar ion concentration in leaves of lemon (*Citrus lemon* L.) trees irrigated with NaCl or Na₂SO₄. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 173-185.
- White, P.J. (1999). The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Trens Plant Sci.* 4(7): 245-246.
- Winyard, P.G., Moody, C.J., Jacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends in Bioche. Sci.* 30: 453-461.
- Wu, J.L., Seliskar, D.M., Gallagher, J.L. (1998). Stress tolerance in the marsh plane *Spartina patens*: impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition. *Physiol. Plant.* 102: 307-317.

- Wutscher, H.K. (1989). Growth and mineral nutrition of young orange trees grown with high levels of silicon. *Hort. Science*. 24: 275-277.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikehara, N. (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol*. 115: 1405-1412.
- Yeagle, P.L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 822: 267-287.
- Yeagle, P.L. (1991). Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochem.* 73: 1303-1310.
- Yeo, A.R. (1983). Salinity resistance: physiologies and prices. *Physiol. Plant*. 58: 214-222.
- Yeo, A.R. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49: 915-929.
- Yeo, A.R., Flowers, S.A., Rao, G., Welfare, K., Senanayake, N., Flowers, T.J. (1999). Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpiration bypass flow. *Plant, cell Envir.* 22: 559-565.
- Yeo, H.C., Liu, J., Helbock, H.J., Ames, B.N. (1999). Malondialdehyde assay in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 300: 70-78.
- Zekri, M. (1993). Seedling emergence, growth, and mineral composition of three citrus rootstocks under salt stress. *J. Plant Nutr.* 16: 1555-1568.
- Zekri, M., Parsons, L.R. (1992). Salinity tolerance of citrus rootstocks: effects of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant and Soil*. 147: 171-181.
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci.* 167: 527-533.

Anexo I

Constituição do fertilizante aplicado

Constituição do fertilizante, aplicado nos ensaios *in vivo* com cultivares de citrinos.

Macro- e micronutrientes	meq/l
$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	8,0
PO_4H_2	1,0
K^+	1,5
Ca^{2+}	4,0
Mg^{2+}	1,0
CE final	0,775

Sendo a condutividade eléctrica (CE) da solução de $0,775 \text{ dS m}^{-1}$ e da água de rega $0,225 \text{ dS m}^{-1}$, então a CE final da solução controlo utilizada foi de 1 dS m^{-1} .

Anexo II

Determinação do pH das folhas

Valores de pH obtidos

Amostras	pH (potenciômetro Crison 2002)	T (°C)
1	6,29	19,5
2	6,32	
3	6,25	
4	6,38	
Média	6,31	

O valor de pH utilizado foi de 6,30.

