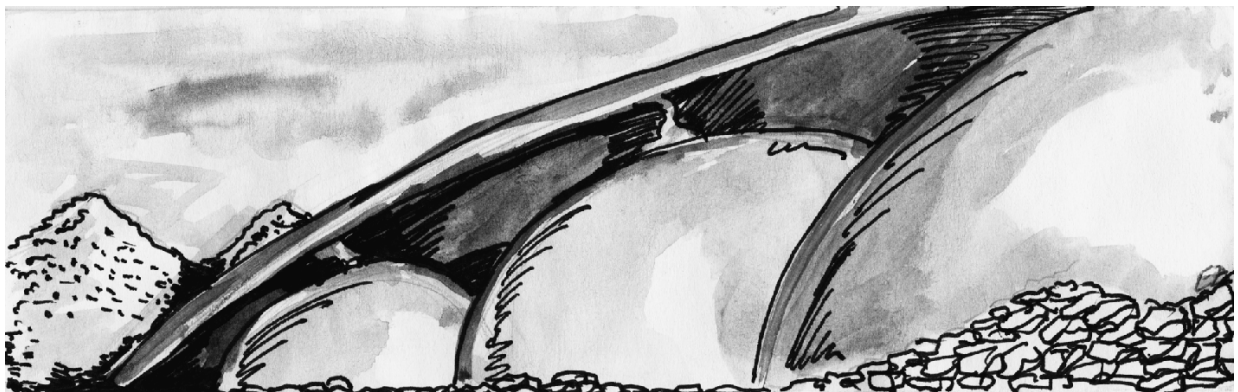




**Etelvina Maria de
Almeida Paula
Figueira**

**Aspectos da tolerância salina em *Pisum sativum*
L.: influência da nutrição azotada**





Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia
2000

Etelvina Maria de
Almeida Paula
Figueira

Aspectos da tolerância salina em *Pisum sativum* L.:
influência da nutrição azotada

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Gustavo Cardoso Nunes Caldeira, Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Doutor Jorge Carvalho Arroteia, Professor Catedrático da Universidade de Aveiro.

vogais

Doutor Gustavo Cardoso Nunes Caldeira, Professor Catedrático da Universidade de Aveiro (Orientador).

Doutor Gil da Silva Cruz, Professor Associado da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Doutor Francisco Barreto Caldas da Costa, Professor Associado da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Doutor Fernando José Cebola Lidon, Professor Associado da Universidade Nova de Lisboa.

Doutora Hortense Deolinda Quinteira de Matos Caldeira, Professora Associada da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Doutor Gustavo Caldeira, Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, orientador desta tese, pelo seu sentido crítico, rigor científico, ensinamentos e disponibilidade ao longo de todas as etapas deste trabalho.

À Doutora Hortense Caldeira, Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, por ter disponibilizado algumas das suas seminaristas para o trabalho laboratorial e ainda pelo apoio e incentivo que sempre me concedeu.

À Licenciada Brígida Monteiro, pela sua amizade e pelo bom ambiente de trabalho que sempre promoveu ao longo do extenso trabalho laboratorial desenvolvido em conjunto.

Ao Engenheiro Manuel Tavares de Sousa, Investigador Principal com Agregação da Estação Nacional de Melhoramento de Plantas em Elvas, pela disponibilidade que sempre mostrou e por ter proporcionado as condições necessárias ao isolamento de *Rhizobium* a partir de solos da referida Estação.

Ao Engenheiro Luís Cerqueira, funcionário da empresa Friopesca, pelo fornecimento gratuito de sementes das cultivares de *Pisum sativum* L. utilizadas neste trabalho e por ter proporcionado as condições necessárias ao isolamento de *Rhizobium* a partir de solos da Costa Nova e de Vagos.

Ao Engenheiro Armando Costa, Técnico Profissional do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, pela disponibilidade e pelo auxílio no trabalho laboratorial.

À Dona Maria José Francisco, Auxiliar Administrativa do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, pela amizade e pelo encorajamento que me concedeu ao longo de todo o trabalho.

Ao Doutor Peter van Berkum, “Curator” do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), pela disponibilidade que sempre evidenciou no envio de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae*.

À Doutora Carmen Lluch, da Universidade de Granada, pelo envio de uma estirpe de *Rhizobium leguminosarum*.

Ao Engenheiro Abílio Borges, Assistente Convidado do Departamento de Mecânica da Universidade de Aveiro, pela ajuda no processamento informático do trabalho escrito.

À Licenciada Lísia Lopes pela ajuda no processamento informático das imagens.

Ao Arquitecto Ricardo Lincoln, pela ilustração da capa do trabalho.

Às alunas, Ana Rosário Silva, Ana Sofia Matos, Luísa Dinis, Marta Silva, Paula Tavares, Sandra Gago e Sandra Gamelas, pelo auxílio no trabalho laboratorial, prestado no âmbito da disciplina de Seminário Científico.

Aos meus pais, Helena e Artur, pelo apoio e encorajamento que sempre me deram.

Ao meu marido, José Maria e à minha filha Mariana, pela compreensão, pelo apoio e pelo carinho que sempre me concederam.

resumo

Os *habitats* salinos são caracterizados pela presença de quantidades de sais solúveis que são prejudiciais ao desenvolvimento da maioria das plantas. Cerca de 7% da superfície total de terra contém solos afectados pela salinidade.

A tolerância salina das plantas baseia-se na manutenção de baixas concentrações citoplasmáticas, uma vez que o seu metabolismo é afectado pela presença de iões de Na^+ e Cl^- em excesso. Os mecanismos que as plantas utilizam para manterem as concentrações iónicas baixas no citoplasma são diversos.

Existe consenso sobre quais as características fisiológicas a abordar para a obtenção de maior tolerância salina, o transporte iónico e a sua compartimentação, a síntese de solutos compatíveis, a protecção dos efeitos nocivos induzidos por condições oxidativas e os processos metabólicos considerados mais sensíveis, são frequentemente referidos

A maioria das leguminosas é bastante sensível ao sal, tendência que aumenta se estiverem dependentes da fixação simbiótica de azoto atmosférico. É, geralmente, aceite que o estabelecimento e a fixação de N_2 são os processos mais afectados pela salinidade.

A maioria das tentativas de aumentar a tolerância salina em leguminosas não resultaram em variedades com uma tolerância salina demarcada, talvez porque os mecanismos subjacentes à tolerância salina ainda não estejam completamente compreendidos.

A idealização deste trabalho teve como principais preocupações a constatação da existência de variabilidade genotípica na tolerância à salinidade em *Pisum sativum* e a avaliação da vulnerabilidade salina da simbiose (capítulo II); a obtenção e a selecção de génotipos de *Rhizobium* que sejam capazes de estabelecer uma simbiose efectiva sob condições salinas (capítulo III); a percepção da influência da nutrição azotada na tolerância salina de *Pisum sativum* ao longo do seu desenvolvimento, bem como a identificação dos mecanismos subjacentes a essa tolerância (capítulo IV); e a análise dos efeitos da salinidade e da nutrição azotada na composição proteica da semente (capítulo V).

A avaliação da tolerância salina de quatro cultivares de *Pisum sativum* ('Resal', 'Tristar', 'Combi' e 'Rauel') evidenciou diferenças entre elas. 'Resal' aparece como a cultivar mais indicada para o cultivo sob condições salinas. A presença de 90 mM NaCl não afectou significativamente o seu crescimento vegetativo. No entanto, 90 mM NaCl provocou uma redução elevada no número de nódulos.

Com o intuito de aumentar a obtenção de azoto simbioticamente fixado sob condições salinas, procedeu-se ao isolamento e à selecção de *Rhizobium* em diversos locais. Os

isolados de S. Bernardo, Costa Nova e Vagos evidenciaram sensibilidade salina, uma vez que o crescimento *in vitro* a 100 mM NaCl provocou inibições de crescimento superiores a 70 %. Apenas os isolados provenientes de um local que durante parte do ano está sujeito a “stress” hídrico (Elvas) evidenciaram tolerância ao sal. Em alguns isolados de Elvas, o crescimento diminuiu menos de 30% em meio suplementado com 700 mM NaCl em comparação com o controlo. A avaliação da eficiência de simbiose entre alguns isolados ou estirpes de *Rhizobium* e *Pisum sativum* abriu boas perspectivas para o estabelecimento de uma simbiose efectiva sob condições de salinidade moderada, devido à obtenção de três isolados que, simultaneamente, toleraram salinidades de 400 mM e propiciaram o maior crescimento da parte aérea.

A forma de azoto disponibilizada influenciou o crescimento e a tolerância salina de *Pisum sativum*. A produtividade foi o parâmetro que melhor evidenciou essa influência. As plantas dependentes do nitrato foram as que demonstraram menor diminuição da produtividade. As diferenças de tolerância observadas só conseguem ser explicadas pela existência simultânea de mais do que um mecanismo, cujas intensidades parecem variar ao longo do tempo. À osmoregulação, conseguida parcialmente pela acumulação de Na^+ , Cl^- e K^+ , associa-se a exclusão de Na^+ da parte aérea.

Embora a síntese proteica seja reconhecida como uma actividade celular sensível ao sódio, com excepção das plantas dependentes da fixação simbiótica de N_2 , a salinidade provocou o aumento do conteúdo proteico nas sementes. Facto que não será alheio à manutenção de baixas concentrações de Na^+ e Cl^- neste órgão. Os perfis dos polipeptídicos mais abundantes não foram muito influenciados pelas condições de crescimento impostas. Contudo, a salinidade induziu o aparecimento de novos polipeptídeos que poderão conferir a este órgão maior tolerância ao aumento de níveis de Na^+ e Cl^- detectados nas plantas a crescer sob 90 mM NaCl.

Em conclusão, este trabalho facultou o melhor conhecimento das respostas de *Pisum sativum* à salinidade, bem como de alguns factores que condicionam estas respostas. Os resultados permitem afirmar que, sob condições controladas, é possível o cultivo de *Pisum sativum* ‘Resal’ sob salinidade moderada (90 mM) sem grande diminuição de produtividade, desde que às plantas sejam fornecidos níveis adequados de azoto na forma de nitrato.

Todavia, este trabalho também suscitou algumas questões: será que o estudo da tolerância salina de outras cultivares de *Pisum sativum* poderá dilatar o intervalo de tolerância da espécie? Será que a selecção de novos isolados de *Rhizobium* poderá permitir o aumento da eficiência de nodulação em *Pisum sativum*? Quais os solutos orgânicos que as células de *Pisum sativum* acumulam de modo a ajustarem osmoticamente o citoplasma? Qual o gradiente de concentração de sódio e cloro através do tonoplasto em cada um dos órgãos da planta? Qual a resposta das plantas, sob stress salino a uma nutrição mista de azoto diatómico fixado simbioticamente e de menores níveis de nitrato?

abstract

Saline habitats are those containing soluble salts concentrations that impair glycophytes growth. Nearly 10% of the total land surface is covered with different types of salt affected soils.

Plants maintain low cytoplasmic sodium ion concentrations as a mean to achieve salt tolerance, once the excess of Na^+ and Cl^- ions affect their metabolism. Plants usually, rely on different mechanisms to maintain low cytoplasmic ion concentrations.

There as been reasonable consensus on which physiological characteristics must be improved, to achieve salt tolerance. The attention is focused on ion transport and compartmentation, synthesis of compatible solutes, protection against deleterious oxidative effects, and metabolic processes that are salt sensitive.

Most of legume plants are quite sensitive to salt, and this sensitivity is even grater when relying on dinitrogen fixation. Usually, nodule establishment and N_2 fixation are considered the most salt sensitive phase in the symbiotic process.

Most of reported attempts to enhance legume salt tolerance didn't result in salt tolerant varieties, probably because the mechanisms that afford salt tolerance are difficult to understand.

The main purposes of the present work are: the existence of genotipic difference among *Pisum sativum* and simbyosis salt sensitivity evaluation (chapter II); *Rhizobium* isolation and screening for N_2 fixation efficiency under saline conditions (chapter III); nitrogen nutrition influence on *Pisum sativum* growth under salt stress and the mechanisms on which they rely to achieve salt tolerance (chapter IV); and salinity and nitrogen nutrition effects on seed protein composition (chapter V).

The salt tolerance evaluation of four *Pisum sativum* cultivars resulted in significant differences among them. 'Resal' showed the highest tolerance with no significant vegetative growth reduction up to 90 mM NaCl in the soil.

Rhizobium isolation and screening in different Portuguese locations was performed with the purpose to improve N_2 fixation under salt conditions. Costa Nova, S. Bernardo and Vagos isolates showed saline sensitivity, since *in vitro* growth at 100 mM NaCl was reduced more than 70%. Only *Rhizobium* isolates from a water stressed site (Elvas), showed salt tolerance, growing under 700 mM NaCl. The symbiosis evaluation between *Pisum sativum* and *Rhizobium* isolates showed the possibility of an effective symbiosis under salt conditions.

The molecular nitrogen form made available to plants influenced *Pisum sativum* growth and salt tolerance, and especially productivity. Nitrate dependent plants productivity was less affected by salinity. The observed salt tolerance differences can only be

explained by more than one mechanism acting together, whose intensities changed during plant growth. The osmotic regulation was achieved, at least partially, by Na^+ , K^+ and Cl^- accumulation, and by Na^+ shoot exclusion.

Although, protein synthesis is generally considered a salt sensitive process, salinity caused increased protein seed content, exception being made by N_2 fixation dependent plants. The maintenance of low seed Na^+ and Cl^- concentrations would account, to some extent, to this result. Protein SDS-PAGE separation revealed that growth conditions didn't affect considerably seed polypeptides. Nevertheless, salinity induced new polypeptides which may, some how, improve seed salt tolerance.

This work made possible a better knowledge of *Pisum sativum* responses to salinity and of factors that influenced those responses. Under mild salt conditions (90 mM NaCl) *Pisum sativum* 'Resal' can be grown without significant productivity reductions if, supplied with nitrate.

But this work also raised some questions: the saline tolerance evaluation of other *Pisum sativum* cultivars could expand the species saline tolerance? *Rhizobium* isolation and screening in other sites could increase nodulation and N_2 fixation efficiency under salinity? Which compatible solutes does *Pisum sativum* accumulate in the cytoplasm? Which is the Na^+ and Cl^- gradient concentration through tonoplast in each plant organ? How does plant respond to a mixed nitrate and N_2 fixation nitrogen nutrition?

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Abreviaturas	xiii

CAPÍTULO I

Introdução geral	1
-------------------------	----------

1. Solos com problemas de salinização	1
2. Sensibilidade das plantas ao sal	2
3. Critérios para a selecção de tolerância salina	4
4. Perspectivas futuras	6
5. Objectivos gerais	7

CAPÍTULO II

Tolerância salina de quatro cultivares de <i>Pisum sativum</i>	9
---	----------

1. Introdução	9
2. Material e métodos	11
2.1. Material vegetal	11
2.2. Cultura de 14 dias	12
2.3. Cultura de 50 dias	12
2.4. Colheita do material vegetal	13
2.5 Análise estatística	13
3. Resultados	14
4. Discussão	17
4.1. Cultura de 14 dias	17
4.2. Nodulação	18
4.3. Cultura de 50 dias	19
5. Conclusão	20

CAPÍTULO III

Tolerância salina de <i>Rhizobium</i> compatível com <i>Pisum sativum</i>	23
--	-----------

1. Introdução	23
1.1. Importância do género <i>Rhizobium</i>	23
1.2. Microbiologia geral do género <i>Rhizobium</i>	24
1.3. Selecção de <i>Rhizobium</i> para inoculação	25

1.4. Influência da salinidade na sobrevivência de <i>Rhizobium</i>	26
1.5 Objectivos	28
2. Material e métodos	28
2.1. Isolamento de <i>Rhizobium</i>	28
2.2. Avaliação da tolerância salina dos isolados e das estirpes de <i>Rhizobium</i>	29
2.3. Selecção da eficiência da simbiose entre <i>Pisum sativum</i> e isolados ou estirpes de <i>Rhizobium</i>	30
2.4 Análise estatística	30
3. Resultados	30
3.1. Isolados e estirpes de <i>Rhizobium</i> disponíveis	31
3.2. Tolerância salina dos isolados e das estirpes de <i>Rhizobium</i>	32
3.3 Eficiência da simbiose entre <i>Pisum sativum</i> e isolados ou estirpes de <i>Rhizobium</i>	36
4. Discussão	36
4.1. Tolerância salina de <i>Rhizobium</i>	36
4.2 Eficiência da simbiose entre <i>Pisum sativum</i> e <i>Rhizobium</i>	39
5. Conclusões	40

CAPÍTULO IV

Tolerância salina de *Pisum sativum*: influência da nutrição azotada **41**

1. Introdução	41
1.1. Crescimento vegetal sob “stress” salino	41
1.2. Nutrição mineral sob salinidade	44
1.2.1. Potássio	45
1.2.2. Cálcio	46
1.2.3. Magnésio	48
1.2.4. Fósforo	48
1.2.5. Sulfato	49
1.2.6. Azoto	50
1.3. Mecanismos de tolerância salina	57
1.4. Objectivos	63
2. Material e métodos	63
2.1 Cultura	63
2.2 Colheita e conservação do material vegetal	64
2.3. Quantificação de iões solúveis	65
2.4. Análise estatística	66
3. Resultados	66
3.1. Crescimento	66
3.1.1. Crescimento vegetativo	66
3.1.2. Produtividade	69
3.2 Concentração iónica	70
3.2.1. Raiz	70

3.2.2. Parte aérea	73
3.2.3. Semente	75
4. Discussão	75
4.1. Crescimento vegetativo	75
4.1.1 Nutrição com nitrato de amónio	75
4.1.2. Nutrição com amónio	76
4.1.3. Nutrição com nitrato	79
4.1.4. Nutrição dependente da fixação simbiótica de azoto diatómico	80
4.2. Semente	82
5. Conclusão	83

CAPÍTULO V

Influência da salinidade e da nutrição azotada na composição proteica de sementes de *Pisum sativum*

87

1. Introdução	87
1.1. Importância da semente	87
1.2. Composição da semente	88
1.3. Efeitos do stress salino na síntese proteica	90
1.4. Objectivos	91
2. Material e métodos	92
2.1. Extracção das proteínas	92
2.2. Quantificação das proteínas totais	92
2.3. Electroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes	92
2.4. Análise estatística	93
3. Resultados	94
3.1. Proteínas totais	94
3.2. Análise electroforética da fracção proteica	96
4. Discussão	97
4.1. Proteínas totais	97
4.2. Análise electroforética da fracção proteica	97
5. Conclusão	100

CAPÍTULO VI

Conclusões finais

101

Bibliografia

105

Adenda

123

Símbolos e abreviaturas

ATP	trifosfato de adenosina
BCP	púrpura de bromocresol
BSA	albumina de soro de bovino
BTB	azul de bromotimol
CR	vermelho do Congo
cv.	cultivar
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiamina tetra acético
g	grama
ha	hectare
kDa	kilodalton
KV	kilovolt
LSD	menor diferença significativa entre médias
M	molar
mg	miligrama
mM	milimolar
MMT	milhões de toneladas métricas
nm	nanómetro
PGA	meio de peptona e glucose agarizado
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfunilo
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
YMA	meio de extracto de levedura e manitol agarizado
YMB	meio líquido de extracto de levedura e manitol
µm	micrómetro

Adenda

Tolerância salina de *Rhizobium*: Tabelas de valores

Nesta adenda, encontram-se expressos os valores utilizados na elaboração dos gráficos III-1 a III-7, expressos no capítulo III.

Tabela A1: Crescimento de isolados (10^7 células mL^{-1}) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola em S. Bernardo. Os valores são médias de 3 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)				
	0	25	50	100	300
SB1	88,58	60,22	28,3	14,16	12,54
SB2	89,41	59	24,75	11,3	10,53
SB3	88,07	71,81	36,89	6,87	8,76
SB4	81,66	87,11	37,41	11,42	8,93
SB5	77,25	61,6	44,46	12,71	10,43
SB6	81,74	16,64	19,92	11,88	7,09
SB7	86,02	72,69	24,51	14,5	10,83
SB8	85,54	18,69	15,16	9,32	7,99
SB9	85,52	45,38	31,81	10,51	10,3
SB10	77,02	48,26	17,15	8,12	7,01
SB11	38,56	12,79	11,3	5,34	7,18
SB12	82,94	66,76	14,47	7,69	7,91
SB13	84,47	68,47	17,44	6,18	11,37
SB14	81,09	36,4	21,76	6,1	7,85
SB15	82,2	73,12	20,64	7,78	9,32
SB16	87,35	57,75	23,81	14,85	9,62

Tabela A2: Crescimento de isolados (10^7 células mL^{-1}) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola em Vagos. Os valores são médias de 3 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)						
	0	15	30	60	90	120	180
V1	38,3	14,43	9,77	10,03	8,89	7,26	4,28
V2	45,52	18,33	12,34	13,72	12,16	9,78	5,69
V3	34,34	13,83	8,22	7,35	5,2	3,04	1,87
V4	46,65	22,01	10,48	8,18	9,22	6,54	3,33
V5	54,12	11,98	7,38	6,22	5,06	4,06	2,36
V6	51,91	7,61	1,013	6,74	6,05	4,85	2,81
V7	50,28	18,79	1,35	7,87	6,65	4,53	2,2
V8	44,98		9,76	5,53			
V9	59,06	12,46	10,55	11,05			
V10	50,35	4,65	3,04				
V11	54	6,17	3,04				
V12	45,77	8,46	4,54				
V13	57,6	27,18	6,34				
V14	63,92	7,81	4,2				
V15	33,46	3,7	3,46				
V16	31,7	6,96	1,98				
V17	54,16	11,35	5,1	9,28			
V18	58,02	7,31	4,65	5,97			
V19	50,54		9,55	3,61			
V20	41,1	8,35	3,78	6,78			
V21	48,98	3,72	3,15	5,88		3,11	
V22	41,12			4,13	5,66	3,28	4,97
V23	50,81	5,01	6,72	4,79			
V24	52,58	6,26	4,63	4,09			
V25	51,87	5,1	5,53	6,74			
V26	50,23	25,36	8,05				
V27	42,39	9,41	4,7				
V28	45,68	8,29	4,99				
V29	46,69	17,48	3,54				
V30	55,35	6,13	5,25	5,41			
V31	44,58	6,19	6,25				

Tabela A3: Crescimento de isolados (10^7 células mL^{-1}) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola na Costa Nova. Os valores são médias de 3 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)				
	0	25	50	100	300
CN1	30,15	10,4	8,16	3,36	
CN2	37,51	12,32	9,18	1,61	
CN3	46,37	20,23	6,82	4,49	
CN4	44,49	15,39	7,2	4,67	
CN5	49,91	13,91	6,13	3,9	
CN6	61,57	41,98	18,1	8,85	
CN7	52,76	42,75	12,14	13,3	
CN8	63,94	32,19	12,37	10,05	6,11
CN9	56,75	41,32	8,21	8,93	0,63
CN10	38,16	11,53	5,07	4,32	
CN11	35,18	21,44	6,76	6,28	2,12
CN12	40,33	9,92	4,83	1,03	
CN13	48,35	26,74	3,52	1,11	
CN14	37,7	10,77	3,75	1,3	
CN15	60,07	54,75	16,06	4,62	
CN16	68,86	36,25	35,72	11,3	
CN17	59,8	32,66	10,63	7,95	
CN18	16,56	10,08	19,15	12,15	
CN19	52,87	21,35	9,47	4,33	1,42
CN20	49,94	49,42	10,26	2,24	2,67
CN21	47,43	16,39	9,2	2,83	1,15
CN22	58,49	44,81	5,69	4,45	0,82

Tabela A2: Crescimento de isolados (10^7 células mL⁻¹) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola em Vagos. Os valores são médias de 3 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)						
	0	15	30	60	90	120	180
V1	38,3	14,43	9,77	10,03	8,89	7,26	4,28
V2	45,52	18,33	12,34	13,72	12,16	9,78	5,69
V3	34,34	13,83	8,22	7,35	5,2	3,04	1,87
V4	46,65	22,01	10,48	8,18	9,22	6,54	3,33
V5	54,12	11,98	7,38	6,22	5,06	4,06	2,36
V6	51,91	7,61	1,013	6,74	6,05	4,85	2,81
V7	50,28	18,79	1,35	7,87	6,65	4,53	2,2
V8	44,98		9,76	5,53			
V9	59,06	12,46	10,55	11,05			
V10	50,35	4,65	3,04				
V11	54	6,17	3,04				
V12	45,77	8,46	4,54				
V13	57,6	27,18	6,34				
V14	63,92	7,81	4,2				
V15	33,46	3,7	3,46				
V16	31,7	6,96	1,98				
V17	54,16	11,35	5,1	9,28			
V18	58,02	7,31	4,65	5,97			
V19	50,54		9,55	3,61			
V20	41,1	8,35	3,78	6,78			
V21	48,98	3,72	3,15	5,88		3,11	
V22	41,12			4,13	5,66	3,28	4,97
V23	50,81	5,01	6,72	4,79			
V24	52,58	6,26	4,63	4,09			
V25	51,87	5,1	5,53	6,74			
V26	50,23	25,36	8,05				
V27	42,39	9,41	4,7				
V28	45,68	8,29	4,99				
V29	46,69	17,48	3,54				
V30	55,35	6,13	5,25	5,41			
V31	44,58	6,19	6,25				

Tabela A3: Crescimento de isolados (10^7 células mL^{-1}) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola na Costa Nova. Os valores são médias de 3 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)				
	0	25	50	100	300
CN1	30,15	10,4	8,16	3,36	
CN2	37,51	12,32	9,18	1,61	
CN3	46,37	20,23	6,82	4,49	
CN4	44,49	15,39	7,2	4,67	
CN5	49,91	13,91	6,13	3,9	
CN6	61,57	41,98	18,1	8,85	
CN7	52,76	42,75	12,14	13,3	
CN8	63,94	32,19	12,37	10,05	6,11
CN9	56,75	41,32	8,21	8,93	0,63
CN10	38,16	11,53	5,07	4,32	
CN11	35,18	21,44	6,76	6,28	2,12
CN12	40,33	9,92	4,83	1,03	
CN13	48,35	26,74	3,52	1,11	
CN14	37,7	10,77	3,75	1,3	
CN15	60,07	54,75	16,06	4,62	
CN16	68,86	36,25	35,72	11,3	
CN17	59,8	32,66	10,63	7,95	
CN18	16,56	10,08	19,15	12,15	
CN19	52,87	21,35	9,47	4,33	1,42
CN20	49,94	49,42	10,26	2,24	2,67
CN21	47,43	16,39	9,2	2,83	1,15
CN22	58,49	44,81	5,69	4,45	0,82

Tabela A5: Crescimento de estirpes (10^7 células mL⁻¹) de *Rhizobium leguminosarum* biovar *vceae* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram enviados pelo USDA e pela Universidade de Granada. Os valores são médias de 6-8 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)																				
	0	15	30	45	60	90	135	180	225	270	300	450	600	700	800	900	1000	1200	1400	1600	
GRA19	58,45	20,66	6,92	6,36	5,79	4,97															
USDA2455	49,58	44,14	18,92	10,66	6,23	3,72															
USDA2335	52,72	56,7	45,73	18,24	15,74	8,73															
USDA2370	50,07	51,68	31,75	12,68	8,31	7,67															
USDA2475	56,96	47,56	39,97	14,67	12,63	7,21															
USDA2343	30,92	31,18	33,04	33,38	33,71	26,37	12,9	8,84	6,83												
USDA2353	26,64	18,6	18,89	20,2	21,5	24,53	28,57	33,1	31,33	33,76	33,97	40,23	50,18	52,25	37,6	39,05	14,45	3,85	1,94	2,85	
USDA2356	32,12	25,24	20,6	23,69	26,78	28,49	34,89	37,04	36,29	36,37	38,43	41,3	39,18	40,34	20,5	15,24	8,37	2,45	3,28	3,05	
USDA2433	27,32	20,43	19,18	19,18	19,18	20,82	28,2	25,33	29,85	31,59	30,57	38,14	48,11	50,01	43,46	38,61	13,03	3,72	3,81	2,36	
USDA2479	38,55	34,43	26,98	26,14	25,3	34,23	42,61	35,39	38,55	38,98	45,71	49,97	48,9	38,71	24,62	18,96	9,96	2,85	3,05	3,94	

Tabela A6: Crescimento de isolados (10^7 células mL⁻¹) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola em Elvas. Isolamento efectuado em 1997. Os valores são médias de 3-7 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)																		
	0	40	80	115	170	225	280	335	390	500	600	700	800	900	1000	1200	1400	1600	1800
E20-4	89,58	5,75																	
E20-1	152,3	135,2	146,08	144,86	137,68	121,38	16,03	12,21	15,68	7,11	4,28	4,13							
E20-2	140,09	143,04	141,65	141,48	139,56	93,05	13,08	16,21	11,22	6,31	6,86	5,45							
E20-3	140,9	141,19	136,99	137,16	138,43	86,2	15	14,99	10,53	6,14	6,02	4,93							
E20-5	147,92	153,06	145,04	142,61	141,42	124,95	16,38	13,16	12,06	1,99	3,14	3,25							
E20-6	142,37	149,24	143,04	139,86	133,59	67,41	12,6	14,27	14,21	8,05	6,35	5,12							
E20-7	140,26			133,36	123	99,67	22,01	18,99	14,21	7	5,59	5,88							
E20-8	155,89	149,62	149,65	140,26	133,12	123,16	33,59	19,73	25,47	7	6,19	5,16							
E20-9	144,23	144,05	144,56	132,13	132,28	112,94	17,25	17,86	20,35	2,45	2,91	3,17							
E20-10	145,53	147,56	146,39	138,78	131,85	90,82	14,93	20,76	16,58	5,94	4,22	4,91							
E24-1	68,09	63,04	60,63	65,02	62,34	59,65	56,97	54,28	51,6	46,23	42,66		45,19	41,97	44,58	10,2	7,18	2,42	2,37
E24-2	70,37	69,3	82,33	75,63	67,29	63,3	59,31	55,33	51,34	47,7	44,32	42,75	43,36	42,93	41,27	9,76	8,22	2,16	3,4
E1-1	52,7	50,23	64,54	53,97	53,09	52,75	52,4	52,05	51,07	51,54	54,93	55,1	51,01	50,32	49,88	16,05	6,13	3,89	2,46
E1-2	55	56,99	58,15	50,27	59,5	58,37	58,25	56,12	55	42,4	49,01	49,71	52,75	51,01	53,88	22,31	5,53	2,33	1,94
E2-1	52,08	51,91	57,08	56,84	55,3	53,84	52,39	50,94	49,49	46,67	46,4	52,49	46,58	44,84	39,71	44,66	39,36	23,96	12,37
E2-2	43,34	39,92	38,4	39,75	41,38	40,56	39,75	38,93	38,12	34,05	35,58	34,98	36,49	32,66	23,53	25,09	30,05	34,75	16,14
E2-3	51,23	48,06	51,41	52,06	51,04	48,37	45,7	43,02	40,35	33,36	35,01	33,18	35,01	31,27	21,96	28,75	33,53	33,18	16,14
E2-4	43,16	44,64	41,58	42,84	41,44	40,75	40,05	39,36	38,66	37,97	36,49	35,18	37,27	37,88	23,18	26,14	28,49	31,79	12,81
E3	59,56	57,19	65,45	67,89	60,53	57,53	54,52	51,51	48,5	46,84	44,49	49,62	42,49	44,75	27,36	7,87	2,51	2,07	2,2
E6	52,57	49,48	67,41	62,41	58,16	56,96	55,75	54,55	53,34	53,97	57,71	51,45	50,93	50,84	44,4	17,14	12,55	3,98	6,92
E4-1	60,94	56,65	67,06	61,45	52,8	51,96	51,13	50,3	49,47	55,62	52,75	48,58	47,8	43,53	41,97	15,31	9,52	1,22	3,02
E4-2	67,83	69,61	65,76	61,93	46,18	45,87	45,56	45,25	44,94	60,76	52,49	50,75	44,32	49,01	37,18	9,85	4,22	3,81	1,76
E5	71,67	60,29	59,45		60,74	59,49	58,25	57,01	55,77	50,75	53,97	52,93	53,28	50,84	52,15	10,2	2,16	1,18	1,76

Capítulo I

Introdução geral

1. Solos com problemas de salinização

Os *habitats* salinos são caracterizados pela presença de quantidades de sais solúveis prejudiciais ao desenvolvimento da maioria das plantas (Subbarao e Johansen, 1994). As áreas salinas compreendem zonas que circundam o mar, como sapais e manguais. Estas áreas estão sujeitas a inundações periódicas, razão pela qual o nível de salinidade flutua. As zonas salinas interiores encontram-se em pântanos que rodeiam lagos salgados e em regiões áridas e semi-áridas, onde a pluviosidade não é suficiente para que ocorra a lixiviação da maioria dos iões acumulados pela evaporação da água. (Poljakoff-Mayber e Lerner, 1994; Marschner, 1995).

Cerca de 955 milhões ha da superfície total de terra contém solos afectados pela salinidade. Szabolcs (1994) indica a distribuição das áreas afectadas pelo sal no mapa-múndi e quantifica as áreas com problemas salinos em diversos continentes ou parte deles. As principais áreas afectadas são a Ásia Austral (357,3 milhões ha), o Norte e o Centro da Ásia (211,7 milhões ha) e a América do Sul (129,2 milhões ha). A Europa apenas contém cerca de 50,8 milhões ha. Em termos percentuais, Flowers e Yeo (1995) e Ghassemi *et al.* (1995) referem que 7% da superfície terrestre e cerca de 5% da terra cultivada é afectada por excesso de sais. Esta percentagem tem tendência a aumentar porque 20% de terra irrigada sofreu já salinização secundária (Ghassemi *et al.*, 1995) e porque se supõe que

50% dos regimes de rega utilizam água salinizada (Szabolcz, 1992). Assim, parece inevitável que a terra arável declinará nas próximas décadas. Dever-se-á ter presente que a maioria da terra arável com boas condições para o desenvolvimento vegetal é já utilizada e novas áreas de cultivo terão, possivelmente, algum problema associado, como pouca fertilidade, insuficiente drenagem, propensão à secura, presença de acidez, alcalinidade ou salinidade. Estes problemas talvez constituam a razão de permanecerem até hoje baldias. A ocupação agrícola destas áreas depende do desenvolvimento de culturas, cuja produtividade as viabilize como áreas produtivas (Flowers, 1994).

A salinidade não é, contudo, hostil ao crescimento de todas as plantas. Existem *habitats* onde a salinidade é uma presença constante e que suportam comunidades florísticas mais ou menos complexas. As culturas agrícolas disponíveis é que são, de um modo geral, sensíveis a condições salinas. Os problemas são bem conhecidos, mas as soluções têm demorado a aparecer, apesar do considerável esforço de pesquisa (Flowers e Yeo, 1995).

2. Sensibilidade das plantas ao sal

Todos os organismos eucariotas diferem diametralmente das bactérias halotolerantes que possuem proteínas que apenas são funcionais quando as concentrações salinas do protoplasma são elevadas (Yeo, 1998). As células das plantas mantêm baixas concentrações citoplasmáticas de sódio, mesmo quando a diferença de concentrações através da membrana plasmática é muito elevada (Jeschke e Stelter, 1976; Jeschke, 1984; Hajibagheri e Flowers, 1989; Schachtman, 1991; Greenway e Munns, 1980).

A sensibilidade salina de certos processos ou enzimas individuais que desempenham papéis chave como desencadeadores ou reguladores das principais vias metabólicas, terão um impacto desproporcionado ou limitante na sensibilidade metabólica dos organismos (Yeo, 1998). Um exemplo frequentemente referido é a síntese proteica. As condições necessárias à activação da síntese proteica têm necessidade de uma homeostasia iónica com concentrações e composição bem definidas, favorecendo o potássio em relação ao sódio no citoplasma (Leigh e Wyn Jones, 1984; Greenway e Munns, 1980) e obviando

qualquer vantagem selectiva adicional das células terem enzimas que possam ser tolerantes ao sal (Yeo, 1998).

A troca de dióxido de carbono está directamente ligada à perda de água das plantas, uma vez que o vapor de água sai pelo mesmo local de entrada do dióxido de carbono. A concentração de dióxido de carbono na atmosfera sendo próxima de 0,033%, coloca as plantas numa situação desvantajosa em relação aos animais, implicando perdas elevadas de água por transpiração por forma a obter a quantidade de CO₂ necessária à fotossíntese. Por exemplo, Yeo *et al.* (1997) referiram que uma planta de *Oryza sativa* L. com uma transpiração elevada pode mudar o seu conteúdo hídrico 10 vezes numa hora, ou seja 1000% do seu peso. As plantas substituem a água perdida pela absorção de nova água existente no solo. Se o solo for salinizado, a absorção de água acarretará também a absorção de grandes quantidades dos iões em excesso o que poderá causar efeitos inibitórios no crescimento vegetal. As plantas apenas continuarão a desenvolver-se se conseguirem equilibrar a concentração interna de iões, o que pode ser conseguido pela limitação da absorção de Na⁺ e Cl⁻, pela sua exclusão radicular, pela acumulação nos locais onde os seus efeitos não sejam tão nefastos, sejam eles órgãos ou compartimentos celulares, ou pela excreção “glandular”. De um modo geral, nas plantas com maior sensibilidade os locais de controlo encontram-se, sobretudo, abaixo do solo (menor absorção e maior exclusão nas células radiculares, limitação do transporte para a parte aérea e consequente acumulação na raiz). Pelo contrário, nas plantas que evidenciam maior tolerância, a localização é, sobretudo, aérea (acumulação de iões nos vacúolo das células foliares, em tricomas ou excreção através de “glândulas” salinas).

Do ponto de vista agronómico, a tolerância salina das culturas vegetais pode ser definida como a capacidade das plantas terem uma produtividade economicamente viável sob condições adversas causadas pela salinidade do solo. Uma diminuição de 50% do crescimento ou da produtividade é normalmente considerada como um nível crítico de avaliação da tolerância salina das culturas (Maas e Hoffman, 1977; Flowers, 1994). De um modo geral, as leguminosas são consideradas sensíveis ou moderadamente tolerantes à salinidade (Läuchli, 1984; Zahran, 1991; Saxena *et al.*, 1993). No entanto, tem sido descrita uma variabilidade considerável entre as diferentes espécies de leguminosas. Segundo Subbarao e Johansen, (1994) *Pisum sativum* L. encontra-se entre as leguminosas mais tolerantes (50% de redução da produtividade a cerca de 100 mM NaCl).

As leguminosas têm a capacidade de estabelecer uma endossimbiose com bactérias fixadoras de azoto atmosférico dos géneros *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*. Esta simbiose envolve uma interacção complexa entre o hospedeiro, o microssimbionte e o meio ambiente. O “stress” salino pode afectar de modo diverso qualquer uma das fases da simbiose: a sobrevivência e o crescimento rizobiano no solo ou, mais particularmente, na rizosfera da leguminosa hospedeira; a infecção dos tecidos radiculares; a iniciação e o desenvolvimento dos nódulos; a fixação de N_2 ; e o crescimento do hospedeiro. Muitas estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* conseguem sobreviver e crescer como organismos de vida livre a concentrações salinas que são inibitórias para a maioria das leguminosas (Singleton *et al.*, 1982; Bordeleau e Prévost, 1994; Francois e Maas, 1994; Brewing *et al.*, 1995). Por isso, é geralmente admitido que o hospedeiro e o processo simbiótico são os principais condicionadores da fixação de azoto em condições salinas (Cordovilla *et al.*, 1999^a; Abd-Alla *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 1993; Georgieva e Atkims, 1993).

3. Critérios para a selecção de tolerância salina

Tem havido um consenso razoável dos alvos a abordar para a obtenção de maior tolerância salina. A atenção tem sido canalizada para o transporte iónico e a sua compartimentação, para a síntese de solutos compatíveis, para a protecção oxidativa e para os processos metabólicos considerados mais sensíveis (Yeo, 1998).

A acumulação de sódio e cloro ocorre através dos processos que, normalmente, estão envolvidos na absorção de nutrientes. Tal absorção pode ser minimizada pela composição lipídica das membranas, de modo a minimizar a permeabilidade passiva (Yeo, 1994); pela diminuição do fluxo apoplástico radicular através da endoderme (Yeo, 1994); pela maximização da selectividade de transportadores e canais iónicos, responsáveis pelo transporte activo e passivo de iões através das membranas das células radiculares e do xilema (Jacoby, 1994); pela maximização da eficiência do uso da água, o que minora a acumulação de sais por unidade de novo crescimento. Por outro lado, a manutenção do crescimento é um modo de minimizar os danos provocados pelo sal, porque causa a

diluição dos iões. A contínua substituição das folhas perdidas proporciona a manutenção da área fotossintética (Marschner, 1995).

A limitação dos danos causados pela excessiva absorção de iões poderá ser conseguida através da capacidade das plantas em reterem os iões salinos nas raízes, nos caules e nas folhas mais velhas protegendo, assim, as regiões meristemáticas, os órgãos reprodutivos e as folhas que se encontram no pico de eficiência fotossintética (Marschner, 1995; Greenway e Munns, 1980; Yeo, 1994). A remoção do excesso de sais do mesófilo também constitui uma forma de diminuir a sua concentração em iões. Desde tecidos como a epiderme a estruturas que vão de tricomas unicelulares a complexas “glândulas” multicelulares, todos constituem sistemas eficientes de desvio de iões dos tecidos fotossintéticos (Fricke *et al.*, 1996; Yeo, 1994).

O ajuste osmótico é necessário ao crescimento sob condições salinas. Este pode ser conseguido pela capacidade de aquisição de nutrientes combinada com a elevada selectividade entre sódio e potássio e entre cloro e nitrato (Yeo, 1994); pela compartimentação dos iões salinos nos vacúolos como modo de os desviar do citoplasma, onde a acumulação e síntese de solutos orgânicos compatíveis que têm um efeito neutro ou mesmo protector sobre o metabolismo, equilibram os baixos potenciais hídricos do vacúolo (Harvey *et al.*, 1981; Hajibagheri e Flowers, 1989).

Existem, assim, três categorias de características fisiológicas que são importantes na tolerância salina das plantas: controlo da absorção de iões; acumulação preferencial dos iões em órgãos e compartimentos onde a sua presença seja menos nociva; e ajuste osmótico orgânico de modo a equilibrar os baixos potenciais criados pela selectividade da compartimentação iónica nos vacúolos. Cada um destes processos tem consumos energéticos diferentes. As plantas que utilizam a exclusão iónica e a acumulação de solutos orgânicos como os principais mecanismos para enfrentar o “stress” salino terão gastos energéticos mais avultados do que aquelas que utilizam os iões em excesso no ambiente exterior para a sua osmoregulação interna (Wyn Jones, 1981; Greenway e Munns, 1980), uma vez que as últimas necessitam de muito menor quantidade de solutos orgânicos para complementar a osmoregulação iónica. Se do ponto de vista ecológico a importância da diminuição do crescimento e da produtividade possa ser relativa, o mesmo não sobrevém do ponto de vista agronómico, onde o principal objectivo é a produtividade. Segundo Greenway e Munns (1980) a regulação osmótica baseada em electrólitos é, provavelmente,

a única via de se conciliar tolerância salina e produtividade. Se uma grande parte dos fotossintetizados forem usados como solutos osmóticos, as reduções no crescimento e na produtividade que ocorrem, mesmo a baixas salinidades, inviabilizam o seu cultivo.

Tendo presente os principais pontos a abordar para se conseguir o aumento de tolerância salina é conveniente seleccionar a diversidade de tolerância já existente. A variação genotípica é um pré-requisito para o melhoramento de qualquer espécie a qualquer situação que interfira com o seu desenvolvimento, incluindo a salinidade. As diferenças genotípicas ou varietais de tolerância à salinidade foram descritas para muitas espécies, incluindo *Pisum sativum* (Cerdá *et al.*, 1982). Na maioria dos casos, apenas algumas variedades ou genótipos foram examinados e a variação intraespecífica não foi ainda exaustivamente explorada. Até dentro da mesma variedade ou cultivar ocorre variabilidade de tolerância à salinidade (Noble *et al.*, 1984; Ashraf *et al.*, 1987).

Deverão ser feitos esforços de avaliação sistemática das colecções das principais leguminosas cultivadas, o que poderá permitir estimar a viabilidade da opção genética já disponível. As espécies selvagens relacionadas com as espécies sob estudo, também deverão ser avaliadas como fontes potenciais de aumento da tolerância à salinidade (Subbarao e Johansen, 1994).

4. Perspectivas futuras

Em todo o mundo existe uma expansão de projectos com o objectivo de reabilitarem áreas afectadas pela salinidade (Subbarao e Johansen, 1994). As áreas afectadas pelo sal são encontradas em todas as partes do mundo (Szabolcs, 1994). Com o alastramento da agricultura intensiva, mais países são propensos a problemas de salinidade secundária. Uma vez que as leguminosas são, de um modo geral, menos tolerantes à salinidade do que outras culturas, a salinidade secundária tende a corromper os sistemas de cultura que incluem leguminosas (Subbarao e Johansen, 1994).

A complexidade da resposta das leguminosas à salinidade poderá ser a razão pela qual a maioria das tentativas de aumentar a tolerância salina não resultaram em variedades de leguminosas cultivadas com uma tolerância salina mais marcada, talvez porque a

compreensão dos mecanismos subjacentes à tolerância salina não seja ainda bem conhecida (Subbarao e Johansen, 1994).

5. Objectivos gerais

A idealização deste trabalho teve como principais preocupações: a constatação da existência em *Pisum sativum* de variabilidade genotípica na tolerância à salinidade e a avaliação da vulnerabilidade salina da simbiose entre leguminosa e microsimbionte (capítulo II); a obtenção e a selecção de génotipos de *Rhizobium* que sejam capazes de estabelecer uma simbiose efectiva sob condições salinas (capítulo III); a percepção da influência da nutrição azotada na tolerância salina de *Pisum sativum* ao longo do seu desenvolvimento, bem como a identificação dos mecanismos subjacentes a essa tolerância (capítulo IV); a análise dos efeitos da salinidade e da nutrição azotada no estatuto azotado das plantas, avaliado pelo teor proteico da semente (capítulo V).

Capítulo II

Tolerância salina de quatro cultivares de *Pisum sativum* L.

1. Introdução

A contínua diminuição dos recursos edáficos e da disponibilidade de água doce demonstram a necessidade de desenvolvimento de culturas tolerantes ao sal para consumo da crescente população mundial (Iyengar e Reddy, 1994). A salinidade é uma condição onde a concentração de sais existente afecta o desenvolvimento das plantas, porque interfere com a normal absorção de água, induz a toxicidade iónica e origina desequilíbrios nutricionais associados.

As plantas diferem consideravelmente na tolerância à salinidade e são frequentemente classificadas de acordo com os níveis de salinidade que toleram (Marschner, 1995, Greenway e Munns, 1980). Também intra-especificamente ocorrem diferenças de tolerância salina (Kurban *et al.*, 1999; Mohammad *et al.*, 1989^a; Alfocea, 1993; Rai, 1983; Brown e Hayward, 1984; Noble *et al.*, 1984; Subbarao *et al.*, 1991; Lauter e Munns, 1986; Pessaraki e Zhou, 1990; Velagaleti *et al.*, 1990; Ashraf e Waheed, 1990). A variabilidade genética de uma espécie é não só valiosa como uma ferramenta utilizada para estudar os mecanismos de tolerância, mas também uma base importante para a selecção de maior tolerância à salinidade. A sensibilidade de uma espécie ou cultivar pode variar ao longo da sua ontogenia (Marschner, 1995; Maas e Hoffman, 1977; Ashraf *et al.*, 1986). De um

modo geral, aceita-se que as fases de germinação e de plântula são mais sensíveis à salinidade do que a fase adulta (Ashraf *et al.*, 1986). Blum (1985), Pasternak (1979) e Allen *et al.* (1986) consideraram que as respostas de plântulas e de plantas adultas à salinidade são, habitualmente, concordantes. Pelo contrário, vários autores afirmam que a seleção de culturas a condições salinas, em fases iniciais do desenvolvimento vegetal, podem não se correlacionar com o crescimento nas fases mais avançadas (Ashraf e McNeilly, 1988; Kingsbury e Epstein, 1984; Shannon, 1978). Apesar de tudo, a germinação e o estabelecimento das plântulas são alturas críticas dos ciclos de vida das plantas num ambiente salino (Blum, 1985) e são dados importantes no estabelecimento da tolerância global de uma espécie à salinidade (Ashraf *et al.*, 1986).

A absorção de grandes quantidades de soluções aquosas durante as fases de embebição, germinação e desenvolvimento da plântula levam a que, rapidamente, se acumulem concentrações elevadas de iões quando a solução exterior é salinizada. A redução da germinação sob condições salinas pode ser atribuída ao decréscimo do potencial osmótico da solução exterior, à inibição da mobilização das reservas devido aos efeitos dos iões Na^+ e Cl^- na actividade das enzimas hidrolíticas e na translocação dos produtos resultantes da hidrólise, do órgão de reserva para o eixo embrionário (Iyengar e Reddy, 1994). Em fases mais avançadas do desenvolvimento, a energia e os nutrientes deixam de ser obtidos a partir da hidrólise das substâncias de reserva e passam a sê-lo a partir da absorção radicular e da fotossíntese. Sob salinidade baixa a moderada, as plantas podem não evidenciar sintomas de desidratação ou de clorose e necrose, mas as necessidades energéticas adicionais necessárias à manutenção de um metabolismo normal são satisfeitas por fotossintetizados desviados do crescimento. As plantas morrem quando os níveis de salinidade excedem um determinado valor crítico, que é variável com a espécie, devido ao colapso dos mecanismos fisiológicos (Gale e Zeroni, 1985).

Habitualmente, os diferentes órgãos de um mesmo indivíduo também evidenciam variações de tolerância salina. De um modo geral, a parte aérea é mais sensível do que a raiz. Segundo Gorham *et al.* (1986) e Hajibagheri *et al.* (1987) não é tanto o conteúdo total da parte aérea que é importante mas a capacidade de manter gradientes elevados de Na^+ e Cl^- entre os órgãos mais velhos (caules, pecíolos e limbos de folhas adultas) e os mais novos (inflorescências, sementes e folhas jovens). Do que se expôs, ressalta a importância de se estudar a tolerância salina em vários órgãos ao longo do desenvolvimento ontogénico

das plantas, por forma a colmatar a necessidade urgente de um sistema de cultura que permita o desenvolvimento vegetal sob condições salinas.

O trabalho desenvolvido neste capítulo teve como objectivo principal contribuir para o melhor conhecimento da tolerância salina de *Pisum sativum*. Foram também objectivos avaliar a vulnerabilidade da simbiose entre microssimbionte e hospedeiro, bem como traçar directivas para um estudo subsequente que ajude a esclarecer a acção de alguns factores que condicionam a tolerância observada.

2. Material e Métodos

Neste trabalho foram utilizadas quatro cultivares de *Pisum sativum*: ‘Combi’, ‘Rauel’, ‘Resal’ e ‘Tristar’. Estas cresceram em diferentes concentrações de NaCl, 0, 30, 60, 90, 120 e 150 mM, durante dois períodos de tempo diferentes, 14 e 50 dias.

2.1 Material Vegetal

A ervilheira ocupa um lugar particular na história da ciência conquanto foi a planta que Mendel utilizou no decurso das suas experiências genéticas.

As formas selvagens e primitivas de ervilheiras são encontradas numa vasta região que inclui a Ásia Central, o Mediterrâneo e a Abissínia. *Pisum sativum* L. é considerada como uma das primeiras espécies cultivadas. Os achados arqueológicos indicam que já era cultivada em 6000 A.C. (Marx, 1977).

A espécie *Pisum sativum* L. pertence à família das Leguminosae, subfamília Papilinoideae, tribo Viciaea, género *Pisum*. Segundo Davis (1970 in Smartt, 1990) e van der Maesen (1985 in Smartt, 1990), a taxonomia do género compreende apenas duas espécies, *P. sativum* L. e *P. fulvum* Sibth e Sm. Em *Pisum sativum* L. são englobadas as subespécies *sativum* e *elatius*. A subespécie *sativum* compreende as variedades, *sativum* L. e *arvense* (L.) Pair. As variedades *elatius* (M. Bieb.) Alef, *pumilo* Meikle e *brevipedunculatum* Davis e Meikle são englobadas na subespécie *elatius*. (Smartt, 1990).

O género *Pisum* é, botanicamente, descrito por Franco (1971) como uma erva anual, frequentemente gavinhosa e escandente; folhas geralmente parifoliadas e terminadas em gavinha, raramente reduzidas a uma gavinha ou transformadas em filódios; estípulas geralmente herbáceas. Flores em cachos axilares ou solitárias e axilares. Cálice de actinomórfico a bilabiado, segmentos do cálice grandes e mais ou menos foliáceos; carena geralmente obtusa, asas concrecentes com a carena; estilete pubescente na face superior, raramente glabro, dilatado no ápice, longitudinalmente sulcado e com margens recurvadas. Vagem geralmente oblonga, comprimida, deiscente. Sementes 2 ou mais.

A produção mundial de ervilhas secas é correntemente estimada em 16,3 MMT (milhões de toneladas métricas), tornando-a uma das culturas de leguminosas mais importantes. A produção de ervilhas frescas é muito menor 4,8 MMT. *Per se*, o aumento da produtividade em *Pisum sativum* continua a ser um desafio uma vez que os valores conseguidos estão longe de igualar os atingidos nos cereais (Davies, 1993).

2.2 Cultura de 14 dias

Sementes das quatro cultivares de *Pisum sativum* foram colocadas a germinar em caixas plásticas. As caixas plásticas continham papel de filtro que foi humedecido com água desionizada ou com uma das soluções de NaCl nas concentrações de 30, 60, 90, 120 ou 150 mM, esterilizadas 15 minutos a 121°C. Utilizaram-se 24 caixas, o número necessário para que cada cultivar cresça separadamente em cada salinidade. As caixas foram colocadas numa sala com temperatura controlada, 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 70 μmol cm⁻² s⁻¹. Regou-se sempre que o papel se encontrava quase seco.

2.3 Cultura de 50 dias

Sementes das quatro cultivares foram embebidas em água corrente, à temperatura ambiente, durante 72 horas. As sementes foram, depois, pulverizadas com inóculo comercial contendo várias estirpes de *Rhizobium leguminosarum* e colocadas em vasos

contendo areia passada por ácido, lavada e esterilizada 90 minutos a 121 °C. Em seguida, os vasos foram regados com soluções de nutrientes, cuja composição comum era: 1mM de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM de KH_2PO_4 , 0,25 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mM de K_2SO_4 , 11,25 μM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 μM de H_3BO_3 , 0,5 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Broughton e Dilworth, 1970 in Somassegaram e Hoben, 1994) e que diferiam entre si na concentração de NaCl, 0, 30, 60, 90, 120 e 150 mM. O pH das soluções foi ajustado entre 6,6 e 6,8. Utilizaram-se 48 vasos, o número necessário para haver 2 vasos de cada cultivar a crescer separadamente em cada concentração de NaCl. Os vasos foram, então, transferidos para um compartimento envidraçado, o que proporcionou iluminação natural. Procedeu-se, bissemanalmente, a regas intercaladas de solução de nutrientes ou água desionizada.

2.4 Colheita do material vegetal

Na cultura de catorze dias colheram-se as plântulas pesando-se, separadamente, a raiz e a parte aérea.

Cinquenta dias após a sementeira colheram-se as plantas e após separação da parte aérea, as raízes foram lavadas, primeiro em água corrente e depois em água destilada, por forma a remover a areia. De seguida, enxugaram-se em papel de modo a remover o excesso de água. Anotou-se a presença/ausência de flores ou vagens, bem como a densidade dos nódulos radiculares. Pesaram-se, separadamente, a raiz e a parte aérea.

2.5 Análise estatística

A comparação das médias foi feita através da análise de variância de factor único. A interacção entre a salinidade e a cultivar de *Pisum sativum*, as duas variáveis do crescimento estudadas, foi determinada através da análise de variância de factor duplo com repetição. Nas duas análises estatísticas a probabilidade de erro admitida foi $<0,05$ e o tamanho da amostra foi dezasseis.

3. Resultados

Neste capítulo estimou-se a tolerância salina de quatro cultivares de *Pisum sativum*, de modo a seleccionar uma para trabalho posterior. A avaliação foi efectuada através da análise do crescimento (peso fresco da parte aérea e da raiz) em duas fases do desenvolvimento ontogénico da espécie: início do desenvolvimento vegetativo e floração.

Após 50 dias de cultura, a maioria das plantas encontrava-se em floração. As excepções foram 'Rauel' e 'Combi' a crescer sob 120 e 150 mM que, ontogenicamente, se encontravam mais atrasadas e a cv. Resal sob 60 mM que já apresentava vagens. A análise da densidade dos nódulos presentes na raiz revela a forte influência da salinidade na nodulação. A 30 mM o número de nódulos é semelhante a 0 mM, mas a salinidades mais elevadas diminuiu ou é nulo.

Ao analisar as figuras II-1 a II-5, o facto mais evidente é a diminuição gradual dos pesos da raiz e da porção aérea de todas as cultivares com o aumento da salinidade. No entanto, a baixas concentrações de NaCl, essa tendência nem sempre se manteve e até se inverteu. No início do desenvolvimento (figuras II-1, II-2 e II-3), os pesos das raízes e das partes aéreas não variaram significativamente entre 0 e 30 mM. Para 'Combi', esta tendência manteve-se até 60 mM. Sob 30 mM ocorreram mesmo aumentos significativos de peso, como é o caso das partes aéreas de 'Combi' e 'Resal' e da raiz de 'Resal'. Na fase de floração (figuras II-4 e II-5), apenas nas maiores salinidades (120 e 150 mM) ocorreu redução de crescimento. Com efeito, nas restantes salinidades (0, 30, 60 e 90 mM), os pesos das raízes e das partes aéreas não foram significativamente diferentes em 'Rauel' o peso da parte aérea a 30 mM foi até significativamente maior do que a 0 mM. 'Tristar' é a excepção, com reduções de crescimento significativas ao longo de todo o intervalo de salinidade.

As duas condicionantes do crescimento estudadas, salinidade e cultivar, interagiram entre si. A salinidade do meio afectou de modo significativamente diferente o crescimento das quatro cultivares nos dois períodos de desenvolvimento analisados.

No início do crescimento, 'Resal' surge como a cultivar menos sensível à salinidade. O facto é mais notório na parte aérea e nas salinidades entre 60 e 150 mM, onde esta cultivar atinge pesos significativamente maiores do que as restantes cultivares (figuras II-2 e II-3).

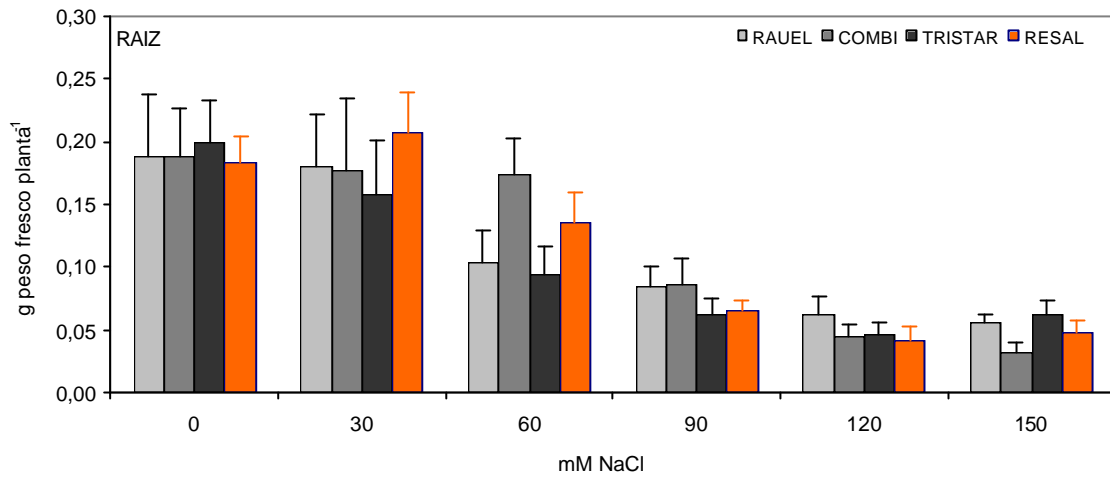


Figura II-1: Crescimento da parte radicular de plântulas de *Pisum sativum* submetidas durante 14 dias a diferentes concentrações de salinidade. Os valores são médias (\pm DP) de 16 réplicas.

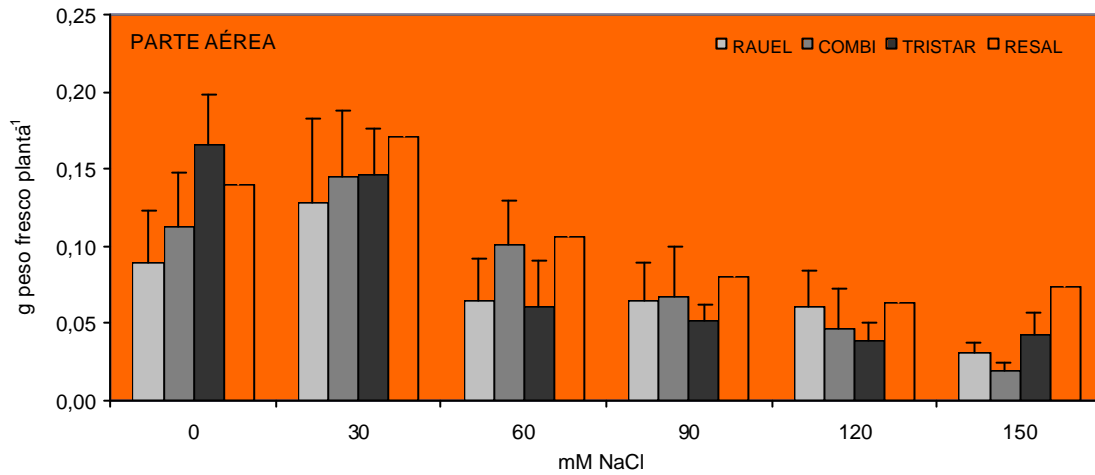


Figura II-2: Crescimento da parte aérea de plântulas de *Pisum sativum* submetidas durante 14 dias a diferentes concentrações de salinidade. Os valores são médias (\pm DP) de 16 réplicas.

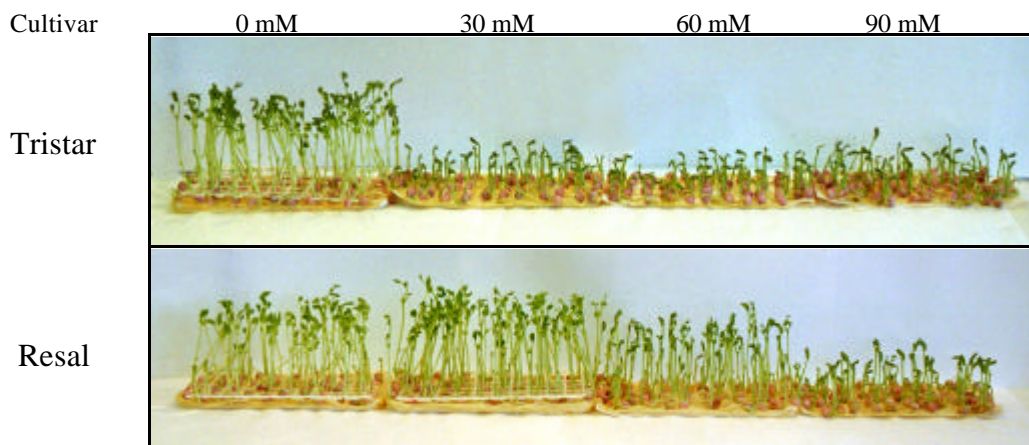


Figura II-3: Fotografias do crescimento da parte aérea de plântulas de *Pisum sativum* das cv. Tristar e Resal, submetidas durante 14 dias a diferentes concentrações de salinidade.

Durante a floração, o seu comportamento indicia a homogeneidade de resposta das cultivares às maiores salinidades, 120 e 150 mM (figura II-4 e II-5). O intervalo entre 30 e 90 mM evidencia a maior sensibilidade de 'Tristar' e a maior tolerância de 'Resal'. Com o aumento de salinidade até 90 mM a variação de peso da parte aérea comprova a menor sensibilidade de 'Resal' face às restantes cultivares (figura II-5), o mesmo não acontecendo com a raiz onde o comportamento foi semelhante a 'Rael' e a 'Combi' (figura II-4).

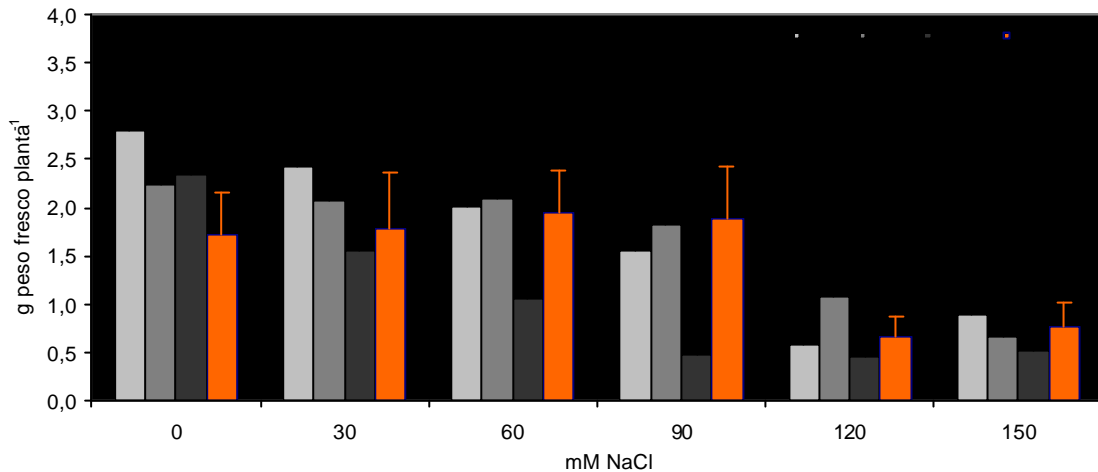


Figura II-4: Crescimento da parte radicular de plantas de *Pisum sativum* submetidas durante 50 dias a diferentes concentrações de salinidade. Os valores são médias (\pm DP) de 16 réplicas.

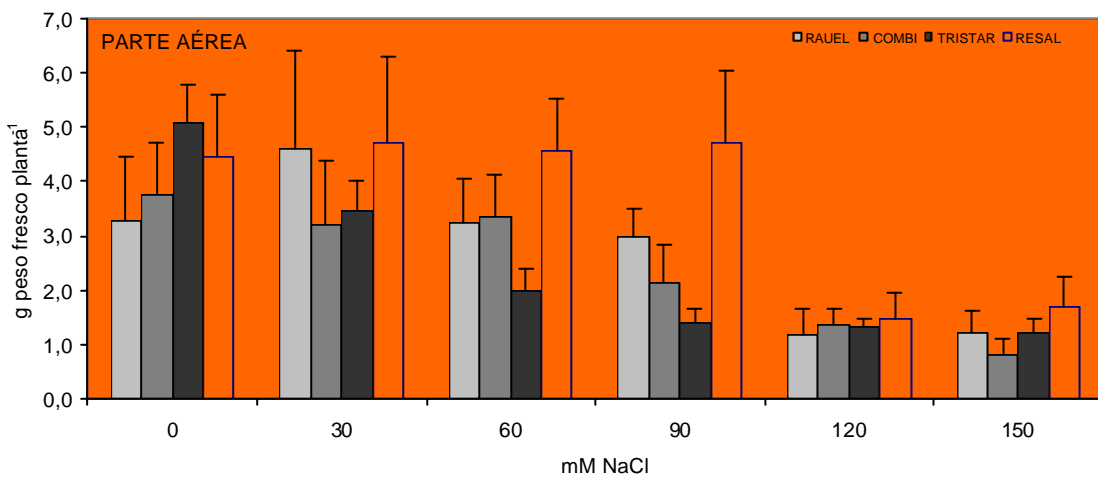


Figura II-5: Crescimento da parte aérea de plantas de *Pisum sativum* submetidas durante 50 dias a diferentes concentrações de salinidade. Os valores são médias (\pm DP) de 16 réplicas.

4. Discussão

Têm sido vários os critérios utilizados para a selecção da tolerância à salinidade. A tolerância salina de uma espécie pode ser definida de vários modos, consoante a finalidade do estudo (Subbarao e Johansen, 1994). Neste capítulo, considerou-se a tolerância salina como “a ausência de efeitos negativos no crescimento da planta a desenvolver-se sob salinidade” (Levitt, 1980).

4.1 Cultura de 14 dias

A fase inicial de desenvolvimento vegetal é frequentemente abordada, não só porque esta fase é geralmente considerada como a mais sensível do ciclo de vida das plantas (Ashraf *et al.*, 1986) mas também porque espécies relativamente tolerantes à salinidade sejam, nesta fase, particularmente sensíveis, como é o caso de *Beta vulgaris* L. (Marschner, 1995). A capacidade de germinação está relacionada com o grau de embebição das sementes e com a actividade do embrião. A mobilização das substâncias de reserva existentes nos cotilédones e o seu transporte para o embrião em crescimento são factores críticos. O que é corroborado pelos resultados obtidos na cultura de 14 dias. De facto, os pesos das raízes e partes aéreas de todas as cultivares a crescerem sob as salinidades mais elevadas (120 e 150 mM) são duas a cinco vezes menores do que aquelas que cresceram na ausência de NaCl (figuras II-1, II-2 e II-3) e é revelador da influência negativa que a salinidade tem no início do desenvolvimento vegetativo. Nesta fase, as plântulas têm de utilizar o mais eficientemente possível as reservas existentes nos cotilédones de modo a “montar” toda a maquinaria metabólica que lhe permitirá estabelecer-se como um organismo auto-suficiente. A presença de NaCl diminui o potencial osmótico da solução exterior dificultando a absorção de água, primeiro das sementes e depois das jovens plantas levando à diminuição da turgescência, com os inevitáveis efeitos associados na expansão celular e no alongamento foliar (Marschner, 1995). Mas o crescimento num meio salino implica sempre a absorção de iões Na^+ e Cl^- , que a partir de certas concentrações são tóxicos. A exclusão ou compartimentação destes iões, dois dos mecanismos a que as plantas recorrem para conseguirem sobreviver em ambientes salinos são, do ponto de vista termodinâmico,

fortemente endotérmicos (Wyn Jones, 1981). Deste modo, a proporção de energia armazenada nos cotilédones que é utilizada nos processos de desenvolvimento e estabelecimento da plântula é muito menor.

A variação genotípica de tolerância à salinidade tem sido descrita em muitas espécies de leguminosas, incluindo *Pisum sativum* (Cerda *et al.*, 1982; Dua *et al.*, 1989), em várias fases do desenvolvimento ontogénico. Alguns trabalhos procuram, tal como este capítulo, abordar a variação intra-específica no início do desenvolvimento das plantas, como é o caso de Pessaraki (1994), Smith (1994), Velagaleti e Schweitzer (1994) e Mohammad (1989). Pessaraki (1994) estudou os efeitos da salinidade na produção de matéria seca de três cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., classificada como uma espécie sensível (Marschner, 1995). Durante a fase de crescimento inicial o NaCl reduziu significativamente a produção das três cultivares. No entanto, uma delas foi menos afectada em todos os níveis de salinidade. Smith (1994), analisou o efeito da salinidade na germinação e no crescimento antes e logo após a emergência em *Medicago sativa* L. e concluiu haver diferenças significativas de germinação e de crescimento inicial. Num estudo conduzido por Velagaleti e Schweitzer (1994) nenhuma das cultivares de soja com diferenças de tolerância à salinidade germinaram a 120 mM. Ao utilizar 229 populações de *Medicago sativa*, Mohammad *et al.* (1989^a) tentaram avaliar a tolerância salina desta espécie nas fases iniciais do seu desenvolvimento, germinação e estabelecimento das plântulas. Apenas 29 populações de *Medicago sativa* germinaram bem a 176 mM. Neste capítulo, a variação de crescimento inicial entre as cultivares de *Pisum sativum* a crescerem sob as menores salinidades (30, 60 e 90 mM NaCl) poderá reflectir diferenças de tolerância salina (figuras I-1, I-2 e I-3). O maior crescimento que duas cultivares evidenciaram a 30 mM foi já mencionado por Poljakoff-Mayber e Lerner (1994) em raízes de plântulas de ervilheira a crescer sob 120 mM de NaCl.

4.2 Nodulação

A forte inibição da nodulação radicular provocada pela salinidade é um facto bem descrito na bibliografia (Kumar *et al.*, 1999; Cordovilla *et al.*, 1999^a; Cordovilla *et al.*, 1999^b; Cordovilla *et al.*, 1999^c; Mohammad *et al.*, 1989b; Elsheikh e Wood, 1990; Zahran e

Sprent, 1986). A maioria das espécies de *Rhizobium* não são grandemente afectadas por níveis de salinidade que diminuem significativamente o crescimento da maioria das leguminosas (Francois e Maas, 1994). Se a diminuição da nodulação não se deve à diminuição da população de *Rhizobium* presente no solo, então dever-se-á certamente ao próprio processo de estabelecimento da simbiose, facto corroborado por muitos autores (Kumar *et al.*, 1999; Singleton e Bohlool, 1984; Elsheikh e Wood, 1990; Elsheikh e Wood, 1990; Mohammad, 1989b). Seja qual for o motivo da inibição da nodulação, o que é certo é que a já existente vulnerabilidade provocada pelo “stress” salino aumenta devido a uma insuficiente nutrição azotada.

4.3 Cultura de 50 dias

As reduções elevadas de crescimento na fase de floração que as quatro cultivares evidenciaram enquanto a cresceram nas concentrações mais elevadas de NaCl (120 e 150 mM) podem ser explicadas pelo desequilíbrio nutricional que experimentaram sob estas salinidades ou pelo efeito tóxico da acumulação de Na⁺ e Cl⁻, em especial na parte aérea. De facto, Figueira e Caldeira (1996, 1997) verificaram que plantas de *Pisum sativum* das cultivares Combi, Rael, Resal e Tristar a crescerem sob 120 e 150 mM NaCl exibiram reduções significativas na concentração de K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ e, simultaneamente, aumentos elevados de Cl⁻ e Na⁺ quando comparadas com plantas controlo (0 mM NaCl). O Na⁺ que nas salinidades mais baixas é, preferencialmente, acumulado na raiz, deixa de o ser a 120 e 150 mM. Assim, parece que a salinidades elevadas qualquer das cultivares em estudo não conseguiu excluir de modo eficaz o Na⁺ das partes aéreas, causando elevadas reduções de crescimento ou a morte.

O intervalo de salinidade entre 30 e 90 mM é o que melhor evidencia a diferença de tolerância salina das quatro cultivares sob estudo. A diferença de tolerância observada a baixa salinidade parece prender-se não com o equilíbrio nutricional, concentrações de Mg²⁺, Ca²⁺ e K⁺, nem com a toxicidade de Na⁺ e de Cl⁻ na parte aérea, que foram semelhantes em todas as cultivares, mas com as diferenças de absorção e exclusão do ião sódio a nível radicular (Figueira e Caldeira, 1996; 1997), facto também referido por Marschner (1995). As cultivares mais sensíveis, ‘Tristar’ e ‘Combi’, têm menores

concentrações radiculares de Na^+ e o ajuste osmótico é conseguido, pelo menos em parte, através da acumulação de K^+ , com maior dispêndio energético que poderia ter sido gasto, como já foi anteriormente referido, em funções anabólicas (Figueira e Caldeira, 1996; 1997). Assim, as cultivares parecem ter diferentes estratégias de lidar com o “stress” salino. Também outros autores relataram diferentes mecanismos de tolerância salina dentro da mesma espécie. Rogers *et al.* (1997) verificaram diferenças estratégicas de tolerância salina em duas populações de *Trifolium repens* L. que diferiam na tolerância à salinidade. A população mais tolerante acumulou menores concentrações de Cl em todos os órgãos da planta e restringiu mais eficientemente a translocação deste íon para as folhas e os pecíolos. Läuchli e Wieneke (1979) observaram que a diferença de tolerância evidenciada por variedades de *Glycine max* (L.) Merr. também estava associada à restrição do transporte xilémico de Cl. Alfocea *et al.* (1993) constataram diferentes mecanismos de tolerância à salinidade em várias cultivares de tomate: uma restringiu efectivamente a translocação de Na^+ e Cl para a parte aérea; outra acumulou Na^+ e Cl na parte aérea; ainda uma terceira acumulou Na^+ e Cl na parte aérea e, simultaneamente, possuía conteúdos de K^+ mais baixos do que a segunda.

Do que foi referido deduz-se que *Pisum sativum* tem o comportamento típico de glicófita referido por Greenway e Munns (1980), ou seja, uma relação inversa entre a absorção de sal e a tolerância salina. No entanto, a classificação das glicófitas como exclusoras é normalmente aplicada ao transporte das raízes para as folhas e em particular para as folhas jovens e para o ápice caulinar (Marschner, 1995). Na espécie sob estudo, o mecanismo de tolerância salina depende da manutenção de baixas concentrações de Na^+ na parte aérea da planta e quando esta estratégia se torna incomportável devido a salinidades exteriores demasiado elevadas, acima de 90 mM, ocorre o transporte acrópeto massivo de Na^+ com consequências metabólicas graves que se reflectem no crescimento e na sobrevivência.

5. Conclusão

As quatro cultivares estudadas comprovam *Pisum sativum* como sendo uma espécie moderadamente tolerante ao sal, segundo a classificação de Francois e Maas (1994).

‘Resal’ também confirma a classificação de Marschner (1995), que dividiu as plantas em quatro grupos de acordo com as diferentes respostas de crescimento à presença de sódio, sendo *Pisum sativum* englobada no grupo B. As espécies pertencentes a este grupo podem substituir uma pequena proporção de K^+ por Na^+ com estimulação incipiente do crescimento. Uma vez que existem numerosas cultivares de ervilheira, testar a sua resposta a condições salinas poderá permitir a selecção de cultivares ainda mais tolerantes, dilatando o intervalo conhecido de tolerância salina da espécie.

Resal aparece como a cultivar mais indicada para o cultivo sob condições salinas. O seu crescimento a 90 mM NaCl não foi significativamente afectado em comparação com 0 mM e a sua tolerância talvez possa ser aumentada se a obtenção de azoto não for tão afectada pela salinidade. O que poderá ser conseguido com o aumento da disponibilidade de azoto inorgânico proporcionado por uma simbiose menos afectada pela salinidade, através, por exemplo, da inoculação com estirpes de *Rhizobium* menos sensíveis à salinidade. O conhecimento das estratégias de adaptação também poderá dar um contributo para esse aumento de tolerância ao permitir regular, de forma mais esclarecida, as condições de crescimento.

Capítulo III

Tolerância salina de *Rhizobium* compatível com *Pisum sativum*

1. Introdução

1.1 Importância do género *Rhizobium*

A deficiência em azoto é, frequentemente, um dos factores que mais limita o crescimento vegetal embora a atmosfera contenha 78% de N₂, uma forma de azoto que as plantas não assimilam directamente. O azoto diatómico, quimicamente inerte, pode tornar-se acessível às plantas por fixação simbiótica que, habitualmente, ocorre por endossimbiose entre uma leguminosa e uma bactéria com capacidade de reduzir o azoto diatómico a azoto amoniacal. As plantas fornecem às bactérias hidratos de carbono, possibilitando-lhes condições de crescimento especiais sem a directa competição com os restantes microrganismos que colonizam o solo e as bactérias fixam N₂. (Velagaleti e Cline, 1995).

A associação simbiótica entre leguminosas e bactérias dos géneros *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* é de longe o maior contribuinte para o fornecimento de N₂ fixado biologicamente (Somasegaran e Hoben, 1994). As leguminosas noduladas com estirpes eficientes podem fixar quantidades consideráveis de azoto diatómico. Foram feitas estimativas do N₂ fixado por várias simbioses, podendo atingir 240 a 648 Kg N₂ ha⁻¹ em

Vicia faba, embora na maioria dos casos os valores estejam próximos de 100 Kg N₂ ha⁻¹ (Phillips, 1980; Somasegaran e Hoben, 1994). A quantidade de N₂ fixado por *Pisum sativum* situa-se, com frequência, entre 100 e 250 Kg N₂ ha⁻¹ (Brewing *et al.*, 1993). Uma simbiose efectiva só é conseguida quando os nódulos são formados por bactérias eficientes. Actualmente aceita-se o termo “eficiência simbiótica” para descrever a capacidade de uma leguminosa nodulada em fixar N₂, e esta pode ser expressa qualitativa ou quantitativamente, através do conteúdo total de azoto da planta, peso da parte aérea ou dos nódulos. A eficiência simbiótica é medida por comparação com os resultados de uma estirpe padrão de *Rhizobium*, com leguminosas que recebem uma quantidade adequada de azoto inorgânico ou com leguminosas não inoculadas (Somasegaran e Hoben, 1994).

A capacidade de fixarem o N₂ em simbiose com plantas, especialmente da família Leguminosae, é a característica mais distintiva das bactérias dos géneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Esta característica é também a principal responsável pelo lugar especial que ocupam entre os microrganismos do solo. A fixação de N₂ traz vantagens económicas e ecológicas importantes. Permite o estabelecimento de comunidades vegetais em solos pobres em compostos azotados e é uma forma de aumentar a produtividade em consonância com as tendências actuais, direccionadas para sistemas de cultivo de baixa utilização de fertilizantes minerais, dando resposta a preocupações com o impacto ambiental provocado por aplicações de azoto mineral que, inevitavelmente, introduzem nitratos nas águas superficiais e nos lençóis de água subterrâneos (Brewing *et al.*, 1993; Below, 1995)

1.2 Microbiologia geral do género *Rhizobium*

As bactérias pertencentes ao género *Rhizobium* têm a forma de bastonetes com 0,5 a 0,9 µm de espessura e 1,2 a 3,0 µm de comprimento. As células mais velhas contêm característicos grânulos de poli-γ-hidroxibutirato. Geralmente, são móveis por dois a seis flagelos. Quando coradas pela reacção de Gram, a parede apresenta reacção negativa. São aeróbias, heterotróficas e não formadoras de endósporos. A temperatura óptima de crescimento varia entre 25 e 30 °C e o pH entre 6 e 7 (Jordan, 1984). As bactérias pertencentes a este género apresentam um crescimento rápido. As células turvam o meio de

crescimento líquido em dois ou três dias e têm um tempo médio de duplicação de 2 a 4 horas (Somasegaran e Hoben, 1994). Quando a crescer em meio agarizado as colónias são circulares, convexas, de opacas a semitranslúcidas, elevadas acima da superfície e mucilaginosas. As colónias atingem 2 a 4 mm de diâmetro após 3 a 5 dias de crescimento em meio de extracto de levedura e manitol agarizado (YMA). Como fontes de carbono utilizam uma grande gama de açúcares e sais de ácidos orgânicos, sem formação de gás. A celulose e o amido não são utilizados. Produzem reacção ácida em meio de sais minerais contendo manitol ou outro hidrato de carbono. O crescimento em meio com hidratos de carbono é, normalmente, acompanhado pela produção abundante de uma secreção viscosa extracelular polissacarídica (Jordan, 1984). O *Rhizobium* pode ocorrer em vida livre no solo e nestas condições tem de ter uma capacidade saprofítica que lhe permita competir com os restantes microrganismos do solo. O número de células de *Rhizobium* é relativamente baixo em comparação com outros habitantes do solo. Uma rizosfera favorável encoraja o crescimento e a sobrevivência de *Rhizobium* (Bayoumi *et al.*, 1995). O aumento dos efectivos de *Rhizobium* na rizosfera é a resposta à excreção de nutrientes pelas raízes das plantas, em especial das leguminosas compatíveis e garante a infecção dos pêlos radiculares da planta hospedeira (Bayoumi *et al.*). Todas as estirpes exibem um intervalo de afinidades pelo hospedeiro, ou seja especificidade (Jordan, 1984). No género *Pisum* a nodulação é induzida especificamente por *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae*. Esta biovariedade também nodula, de forma eficiente, outros membros da tribo *Viciaceae*, como sejam os géneros *Viceae*, *Lathyrus* e *Lens*. (Brewin *et al.*, 1993). O estabelecimento de endossimbioses com leguminosas permite o aumento das populações de *Rhizobium* sem competição directa com a restante microflora do solo.

Para além da componente biótica, as populações de *Rhizobium* são também influenciadas pelas condições abióticas do meio, como sejam a temperatura, a humidade, a alcalinidade, a acidez e a salinidade (Somasegaran e Hoben, 1994).

1.3 Selecção de *Rhizobium* para inoculação

O modo mais simples e mais eficiente de isolar *Rhizobium* presente no solo é o de utilizar uma espécie de leguminosa compatível com a biovariedade de *Rhizobium* que se quer obter

e fazer o isolamento a partir dos nódulos. Após as estirpes com capacidade de nodulação terem sido isoladas dos nódulos, tem de ser avaliada a sua capacidade de nodulação e de fixação de N_2 com as leguminosas alvo. A fonte de estirpes de *Rhizobium* para um programa de selecção pode ir de isolados locais a estirpes já testadas noutras partes do país ou a colecções de outros continentes. A primeira crivagem deverá ser executada em estufa, onde numerosas estirpes poderão ser testadas em várias variedades de hospedeiro. Se as plantas inoculadas formarem nódulos e produzirem folhas verdes saudáveis quando a crescerem em meio sem azoto inorgânico, poderá assumir-se que se estabeleceu uma simbiose eficiente (Somasegaran e Hoben, 1994).

A avaliação da simbiose será baseada em vários parâmetros mensuráveis. Ensaio de curta duração, em vasos de Leonard ou em vasos contendo areia estéril, podem fornecer uma base adequada para uma comparação geral entre estirpes. A forma mais directa de avaliar a eficiência da fixação de N_2 é determinar o conteúdo em azoto total da parte aérea que pode ser medido pelo método de Kjeldahl. O peso seco da parte aérea das plantas colhidas na altura da iniciação floral ou após a acumulação significativa de biomassa é geralmente aceite como critério de avaliação da eficiência de fixação de N_2 e o peso seco dos nódulos também é utilizado como um indicador fiável da eficiência de uma estirpe. A eficiência de fixação também pode ser avaliada pela determinação da actividade nos nódulos, utilizando o ensaio da redução do acetileno como medida da actividade das nitrogenases. No entanto, os resultados deste ensaio não deverão ser usados para concluir a quantidade total de N_2 fixado. Uma vez que o conteúdo em azoto total e a biomassa nodular geralmente se correlacionam com o peso da parte aérea, este último parâmetro fornece uma base aceitável para comparação da eficiência simbiótica, entre estirpes (Somasegaran e Hoben, 1994).

1.4 Influência da salinidade na sobrevivência de *Rhizobium*

Os microrganismos conseguem colonizar a maioria dos ambientes terrestres, muitos deles bastante adversos (Bordeleau e Prévost, 1994). O excesso de iões, em particular de sódio e de cloro, é uma dessas situações. São inúmeros os relatos dos efeitos desfavoráveis que o “stress” salino provoca na sua sobrevivência e no seu crescimento e o género *Rhizobium* não constitui excepção (Piceno e Lovell, 1999; Yap e Lim, 1983; Caetano-Anollés *et al.*,

1989). Na maioria das espécies de *Rhizobium* o crescimento diminui rapidamente à medida que a concentração de NaCl aumentou de 0,0 para 0,8% (Chien *et al.*, 1992; Tu, 1981). Contudo, o intervalo de tolerância salina entre os vários genótipos de *Rhizobium* é muito variável. Bayomi *et al.* (1995) descreveram limites de tolerância entre 0,5 % (85,5 mM) e 3,0% (513,3 mM) para várias espécies de *Rhizobium*. Subba Rao (1972) mencionou que o crescimento de *Rhizobium* declinou rapidamente quando as concentrações de NaCl foram aumentadas de 0,2 % (34, 2 mM) para 0,8 % (136,8 mM). Chien *et al.* (1992) conseguiram isolar mutantes espontâneos de *R. leguminosarum* biovar *viceae* e seleccionaram-nos pela sua capacidade em tolerar 200 mM NaCl. Algumas estirpes de *Rhizobium* conseguem sobreviver na presença de níveis salinos extremamente elevados quer em cultura quer no solo. O *Rhizobium* isolado em zonas áridas evidencia, frequentemente, grande tolerância a condições de seca e de salinidade (Bordeleau e Prévost, 1994). Vários autores relataram a sobrevivência de muitas estirpes de *Rhizobium* em soluções com concentração salina próxima da água do mar. (Elsheikh, 1998; Balasubramaniam e Sinha, 1976; Chien *et al.*, 1992; Singleton *et al.*, 1982; Steinborn e Roughley, 1974). Yap e Lim (1983) descobriram que uma estirpe de *Rhizobium* tolerou concentrações de cloreto de sódio até 0,4 M. Bayomi *et al.* (1995) também encontraram uma estirpe tolerante a um nível salino semelhante. Melchor Marroquin *et al.* (1999) isolaram estirpes de *Rhizobium* com tolerância salina a 5% NaCl.

Zahran *et al.* (1994), obtiveram estirpes de *Rhizobium* que diferiam na tolerância ao sal e classificaram-nas em três classes: as mais sensíveis não cresciam a 100 mM NaCl, as halotolerantes sobreviviam a concentrações de NaCl de 1 M e as restantes apresentavam uma tolerância intermédia e foram classificadas como medianamente tolerantes ao sal.

A capacidade de seleccionar estirpes de *Rhizobium* tolerantes a condições ambientais que limitam o crescimento, como a salinidade, foi já demonstrada (Phillips, 1991; Melchor Marroquin *et al.*, 1999; Balasubramaniam e Sinha, 1976; Chien *et al.*, 1992; Singleton *et al.*, 1982; Zaharan *et al.* 1994; Yap e Lim, 1983), o que indica que a variação genética natural em *Rhizobium* é suficientemente ampla para garantir o sucesso da selecção de estirpes apropriadas a tipos particulares de solos (Brewing, 1993).

1.5 Objectivos

Os objectivos deste capítulo prendem-se com a obtenção e selecção de genótipos de *Rhizobium* que simultaneamente sejam capazes de crescer sob condições salinas e de estabelecer uma endossimbiose com plantas de *Pisum sativum* cuja eficiência lhes abone azoto suficiente para um desenvolvimento normal.

2. Material e métodos

Neste capítulo, procedeu-se ao isolamento de *Rhizobium* em diversos locais com diferentes salinidades, disponibilidades hídricas e proveniências geográficas, ao estudo da tolerância salina dos isolados e estirpes e à determinação do seu potencial de fixação de N₂.

2.1 Isolamento de *Rhizobium*

Por forma a obter isolados de *Rhizobium* cultivaram-se plantas de *Pisum sativum* em vasos contendo solos de quatro locais diferentes: (i) um solo agrícola com influência marítima, situado na Costa Nova; (ii) um solo agrícola em Vagos; (iii) um solo agrícola em S. Bernardo; e (iv) um solo, sujeito a seca e temperatura elevada durante parte do ano, da Estação Agronómica de Melhoramento de Plantas em Elvas. Em todos os solos tinha sido cultivado *Pisum sativum*, nesse ano ou em anos anteriores.

Em vasos contendo um dos quatro solos mencionados semearam-se as ervilhas. No solo de Elvas procedeu-se posteriormente a nova sementeira. As plantas cresceram em ambiente protegido, com luz e temperatura ambientes. Procedeu-se a rega com água destilada sempre que a parte superior do solo se encontrava seca. As plantas foram colhidas 30 dias após a sementeira. As raízes foram lavadas e enxugadas. Os nódulos foram destacados, desinfectados em hipoclorito de sódio a 2,5% e lavadas por passagens sucessivas em água

esterilizada. Após a desinfecção, os nódulos foram esmagados na superfície de placas contendo YMA (1% manitol, 0,05% K_2HPO_4 , 0,02% $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0,01% NaCl, 0,05% de extracto de levedura e 1,5% agar-agar, pH 6,8), suplementado com 25 mg L^{-1} de vermelho do Congo (YMA-CR). Uma vez que *Rhizobium* tem, caracteristicamente, uma absorção limitada deste corante, o crescimento durante 3 a 5 dias neste meio diferencial, a 26°C e condições de escuridão forma colónias brancas ou rosa claras. As colónias que apresentavam esta coloração foram repicadas para YMA suplementado com 25 mg L^{-1} de azul de bromotimol (BTB) e para PGA (0,5% glucose, 1% peptona, 1,5% agar-agar) suplementado com 100 mg L^{-1} de púrpura de bromocresol (BCP). O crescimento de *Rhizobium* em YMA-BTB forma colónias com um halo amarelo à volta (excreções ácidas). Em meio de PGA-BCP as colónias não se desenvolvem, ou o seu crescimento é muito reduzido. Após 3 a 5 dias as colónias que apresentavam um halo amarelo em YMA-BTB e que simultaneamente se tinham desenvolvido pouco em PGA-BCP foram classificadas como pertencentes, presumivelmente, ao género *Rhizobium*. A autenticidade dos isolados como culturas puras de *Rhizobium* foi confirmada pelo teste da nodulação, sob condições bacteriologicamente controladas. Com essa finalidade, esterilizaram-se sementes de *Pisum sativum* em hipoclorito de sódio a 2,5% e colocaram-se a germinar 3 a 4 dias em placas de petri esterilizadas com papel de filtro humedecido. As sementes que apresentavam radículas foram colocadas a crescer em frascos de vidro com 200 mL de areia, previamente autoclavados, inoculados com um dos isolados e regados, 2 vezes por semana, com solução de rega ($CaCl_2 \cdot H_2O$, 0,5 mM de KH_2PO_4 , 0,25 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 mM de K_2SO_4 , 11,25 μM de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 1 μM de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2 μM de H_3BO_3 , 0,5 μM de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,1 μM $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 μM $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) sem azoto (Broughton e Dilworth, 1970 in Somasegaran e Hoben, 1994) e esterilizada. Após 30 dias procedeu-se à colheita das plantas. Anotou-se a presença ou ausência dos nódulos e alguns parâmetros do seu aspecto morfológico como o tamanho, a cor, e a distribuição no sistema radicular.

2.2 Avaliação da tolerância salina dos isolados e das estirpes de *Rhizobium*

A capacidade dos isolados de *Rhizobium* obtidos e das estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae* crescerem na presença de NaCl foi avaliada pelo crescimento em YMB suplementado com NaCl, a concentrações que variaram entre 0 e 1,8 M. A avaliação foi feita por níveis que variavam na concentração de NaCl. Do primeiro nível faziam parte as salinidades mais baixas, do último as mais elevadas. Apenas os isolados que mostravam crescimento em todas as concentrações de sal de um nível passavam para o seguinte.

2.3 Seleção da eficiência da simbiose entre *Pisum sativum* e isolados ou estirpes de *Rhizobium*

A eficiência da simbiose foi avaliada pela comparação do peso seco da parte aérea entre plantas de *Pisum sativum* inoculadas com um dos isolados ou estirpes e as plantas controle (não inoculadas). As plantas cresceram sob condições bacteriologicamente controladas, como descrito em 2.1. Após 30 dias de crescimento as plantas foram colhidas. Anotou-se a presença ou ausência de nódulos, bem como os parâmetros morfológicos mencionados em 2.1. A parte aérea foi destacada, colocada a secar 72 horas em estufa a 60 °C e o seu peso determinado.

2.4 Análise estatística

As médias dos pesos secos das partes aéreas de plantas de *Pisum sativum* inoculadas com diferentes isolados ou estirpes foram comparadas pela menor diferença significativa entre médias (LSD). A probabilidade de erro admitida foi $<0,05$ e o tamanho da amostra foi três.

3. Resultados

O isolamento de *Rhizobium* proveniente de populações que colonizam diferentes *habitats* foi efectuado de modo a possibilitar a obtenção de um isolado que tolere salinidades moderadas e que, simultaneamente, proporcione o melhor desenvolvimento possível de plantas de *Pisum sativum* dele dependentes para a obtenção de azoto.

3.1 Isolados e estirpes de *Rhizobium* disponíveis

Tabela III-1: Algumas características das estirpes e dos isolados de *Rhizobium leguminosarum* utilizados no trabalho expresso neste capítulo.

Estirpe ou isolado	Hospedeiro	Localidade	País	Fonte
USDA 2335	<i>Vicia faba</i>		Holanda	P. van BerKum, USDA
USDA 2343	desconhecido		Desconhecido	P. van BerKum, USDA
USDA 2353	desconhecido		Desconhecido	P. van BerKum, USDA
USDA 2353	desconhecido		Desconhecido	P. van BerKum, USDA
USDA 2356	desconhecido		desconhecido	P. van BerKum, USDA
USDA 2433	desconhecido		desconhecido	P. van BerKum, USDA
USDA 2455	desconhecido		desconhecido	P. van BerKum, USDA
USDA 2475	desconhecido		desconhecido	P. van BerKum, USDA
USDA 2479	<i>Vicia faba</i>		Canadá	P. van BerKum, USDA
GRA 19	<i>Vicia faba</i>	Granada	Espanha	C. Lluch, Unv. Granada
V1 a V30	<i>Pisum sativum</i>	Vagos	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
CN1 a CN22	<i>Pisum sativum</i>	Costa Nova	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
SB1 a SB16	<i>Pisum sativum</i>	S. Bernardo	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
E1-1 e E1-2	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
E2-1 a E2-4	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
E3	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
E4-1 e E4-2	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
E5	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
E6	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
E20-1 a E20-10	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
NI-1 a NI-3	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
NII-1 a NII-11	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
SI1-1 a SI1-3	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
SI2-1 e SI2-2	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
SI-3	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
SI-4	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
SI5-1 e SI5-2	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro
SII-1 a SII-8	<i>Pisum sativum</i>	Elvas	Portugal	E. Figueira, Univ. Aveiro

O isolamento de *Rhizobium* a partir de nódulos de plantas de *Pisum sativum* a crescer em vasos contendo solos de várias proveniências possibilitou a obtenção de 128 isolados: 30 de Vagos (Conselho de Vagos), 22 da Costa Nova (Conselho de Ílhavo), 16 de S. Bernardo (Conselho de Aveiro), 23 de Elvas (Conselho de Elvas) em 1997 e 37 de Elvas em 1998. Na tabela III-1 encontra-se expressa a informação relativa a todos os isolados obtidos neste trabalho, bem como às estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* enviadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e pela Universidade de Granada (Espanha).

3.2 Tolerância salina dos isolados e das estirpes de *Rhizobium*

A tolerância salina evidenciada pelos isolados de *Rhizobium* e pelas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* a crescerem em meio líquido é fortemente influenciada pelo seu local de origem (figuras III-1 a III-6).

Todos os isolados de Vagos, Costa Nova e S. Bernardo revelaram grande sensibilidade ao sal. Concentrações de 100mM de NaCl foram suficientes para provocar inibições de crescimento superiores a 70% e em 12 isolados de Vagos, 60 mM foi uma concentração suficiente para inibir totalmente o crescimento.

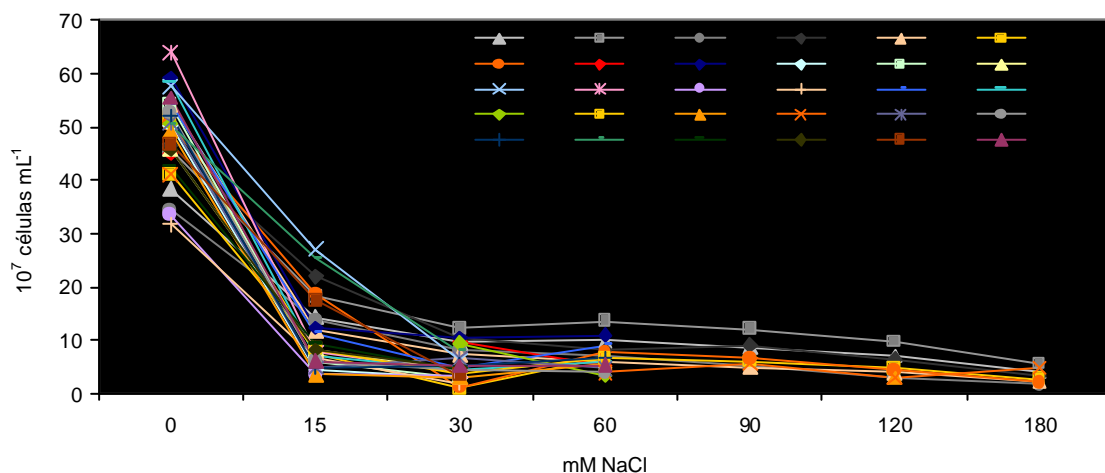


Figura III-1: Crescimento de isolados de *Rhizobium* em YMB suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* a crescerem num solo agrícola em Vagos. Os valores são médias de 3 réplicas.

Os isolados provenientes de Elvas evidenciaram uma resposta muito diferente da anterior. Os isolados obtidos em 1998 exibiram, globalmente, menor tolerância salina do que os

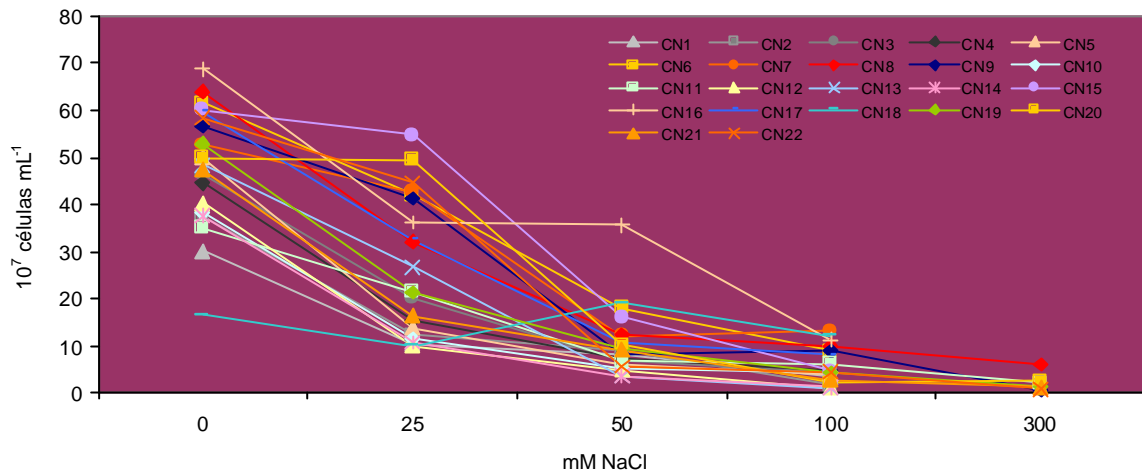


Figura III-2: Crescimento de isolados de *Rhizobium* em YMB suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* a crescerem num solo agrícola na Costa Nova. Os valores são médias de 3 réplicas.

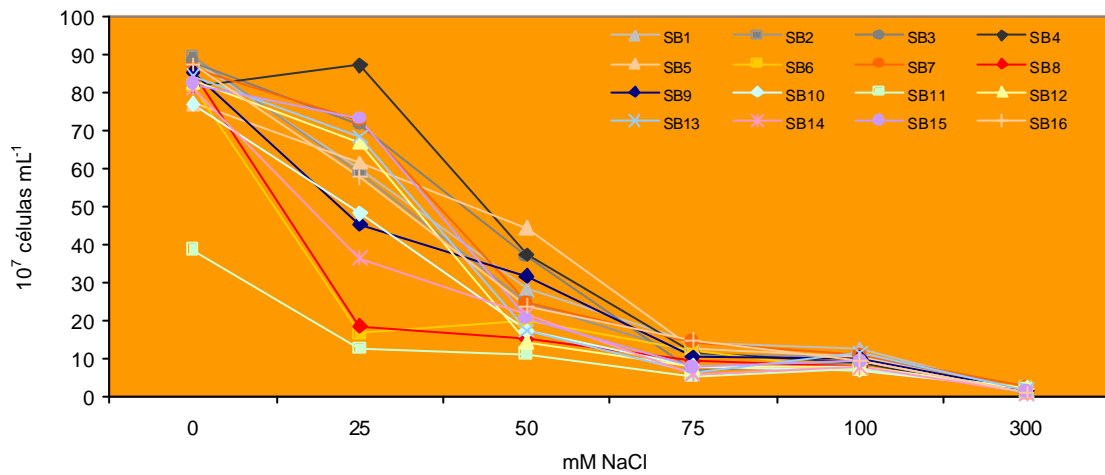


Figura III-3: Crescimento de isolados de *Rhizobium* em YMB suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* a crescerem num solo agrícola em S. Bernardo. Os valores são médias de 3 réplicas.

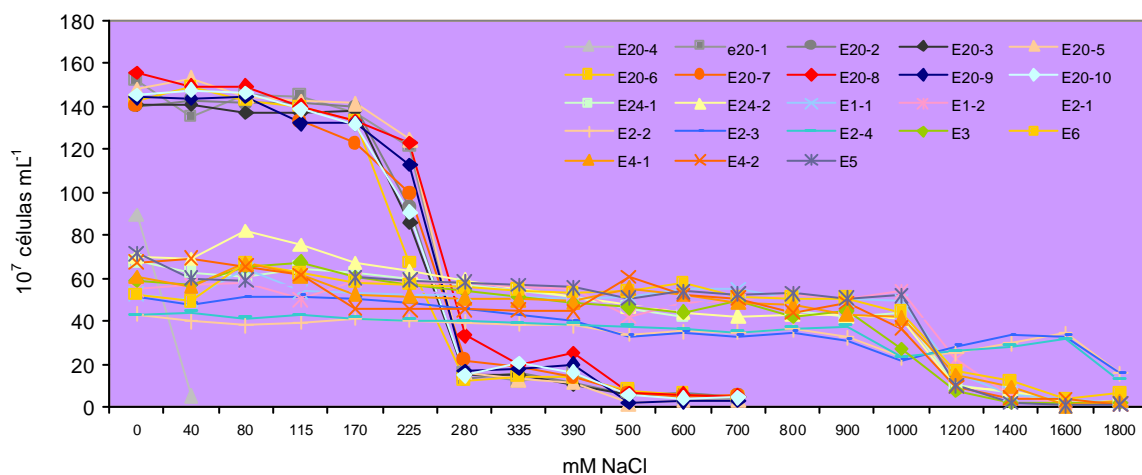


Figura III-4: Crescimento de isolados de *Rhizobium* em YMB suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* a crescerem num solo agrícola em Elvas. Isolamento efectuado em 1997. Os valores são médias de 3-7 réplicas.

obtidos em 1997. Em 1998 só 19% dos isolados toleraram concentrações de NaCl maiores do que 100mM e mesmo estes foram inibidos por concentrações de NaCl superiores a 400 mM (figura III-4). Dos isolados de 1997 apenas um foi inibido por concentrações salinas inferiores a 100 mM e 56,6% evidenciaram ser extremamente tolerantes à salinidade, sob 700 mM NaCl a inibição do crescimento destes isolados foi inferior a 30%.

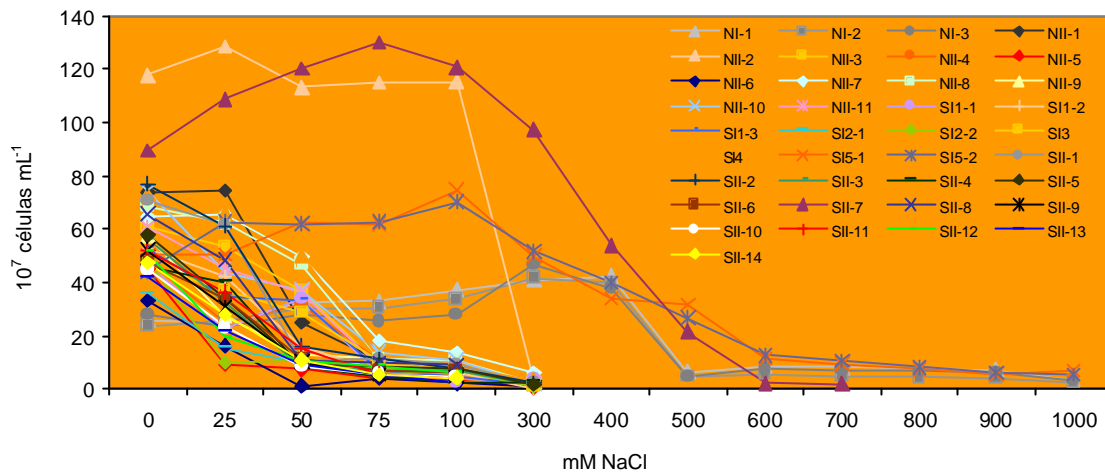


Figura III-5: Crescimento de isolados de *Rhizobium* em YMB suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* a crescerem num solo agrícola em Elvas. Isolamento efectuado em 1998. Os valores são médias de 3-4 réplicas.

As estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* evidenciaram respostas extremas de tolerância ao sal. Quando a crescer sob 90 mM, 50% das estirpes mostraram inibições de crescimento entre 80 e 90% quando comparadas com o controlo (0 mM NaCl). Enquanto sob 600 mM, 40% das estirpes evidenciaram aumentos de crescimento entre 20 e 90%.

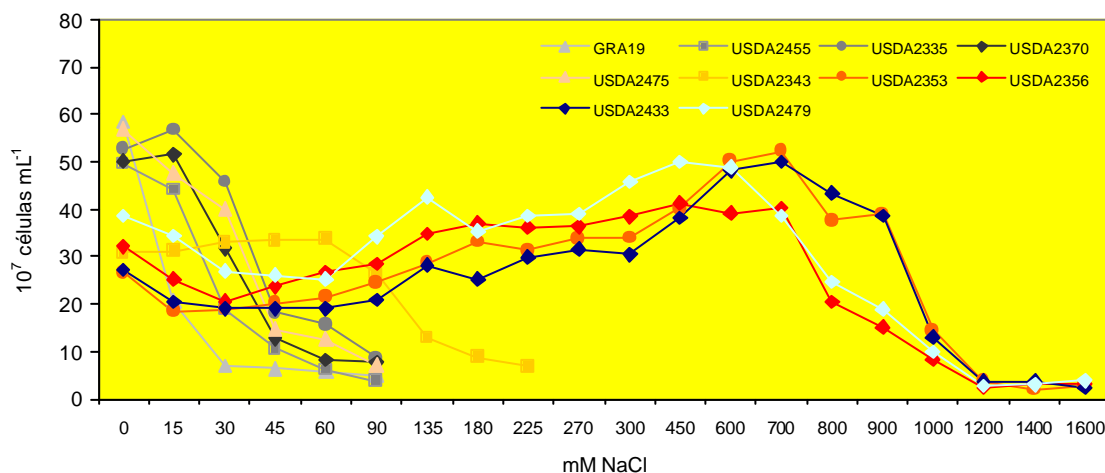


Figura III-6: Crescimento de estirpes de *Rhizobium* em YMB suplementado com diferentes concentrações de NaCl. As estirpes foram enviadas pelo USDA e pela UG. Os valores são médias de 6-8 réplicas.

Figura III-7: Peso seco da parte aérea de plantas de *Pisum sativum* cultivadas 30 dias em condições controladas e inoculadas com diferentes estirpes e isolados de *Rhizobium*. A cor das barras é indicativa da tolerância salina desses isolados e estirpes: cinza- sensíveis; amarela - tolerantes; e vermelha- extremamente tolerantes. Os valores são médias de 3 replicados. LSD= 0,014.

A avaliação da tolerância salina efectuada a 138 isolados e estirpes saldou-se em 76,1% sensíveis (a 100mM a inibição do crescimento foi superior a 70%), 11,6% tolerantes (a 100mM a inibição do crescimento foi inferior a 30% e a 400 mM foi superior a 70%) e 12,3% extremamente tolerantes (a 700mM a inibição do crescimento foi inferior a 30%).

3.3 Eficiência da simbiose entre *Pisum sativum* e isolados ou estirpes de *Rhizobium*

A análise da figura III-7 releva o menor peso das plantas não inoculadas (controlo). O isolado NI-1 foi o que proporcionou maior crescimento, sendo significativamente maior do que qualquer outro. As plantas inoculadas com NI-2, NI-3 e SB2-6 constituem um grupo homogéneo dentro do qual não houve variação significativa de peso. Todos os restantes valores variaram de forma gradual, não havendo diferenças significativas de um valor para o imediatamente mais próximo.

4. Discussão

4.1 Tolerância salina de *Rhizobium* compatível *Pisum sativum*

A tolerância salina dos isolados foi fortemente influenciada pelo seu local de origem. Os isolados provenientes de Vagos foram os que evidenciaram maior sensibilidade ao sal (figura III-1). Concentrações de 30 mM no meio de crescimento foram suficientes para causar inibições no crescimento entre 74% e 98%. O que estará, certamente, relacionado com o facto do local ter grande disponibilidade de água doce durante todo o ano. A pressão ambiental que condiciona a selecção deste local não propicia o aparecimento de uma microflora com capacidade para tolerar condições salinas, o que se traduz numa sensibilidade extrema ao cloreto de sódio.

A sensibilidade ao sal evidenciada pelos isolados obtidos em S. Bernardo (figura III-3) era também esperada, uma vez que é um solo de uma área que durante parte do ano se encontra alagada por um pequeno curso de água doce que atravessa uma das suas extremas.

A sensibilidade salina dos isolados provenientes da Costa Nova não era esperada (figura III-2). Este solo agrícola está situado numa área entre o mar e a ria de Aveiro e seria de prever que a salinidade fosse uma condição presente ao longo de todo o ano e em especial no Verão, quando o solo se encontra com menor teor hídrico e a concentração de iões presentes na solução do solo aumenta. No entanto, todos os isolados obtidos mostraram forte inibição do crescimento (73% a 93%) em meio com 50 mM de NaCl. Facto que talvez possa encontrar explicação na recente formação geológica desta zona e na ainda mais recente ocupação agrícola. A microflora aqui existente não será o reflexo das condições ambientais deste solo, mas antes de áreas próximas utilizadas há mais tempo com fins agrícolas, onde a influência marítima é muito menor. No novo *habitat* a população de *Rhizobium* cresce enquanto as condições lhe são favoráveis e reduz-se quando estas não o são, permanecendo as células com maior tolerância às condições adversas e em microlocais que mantêm a humidade suficiente para assegurar a sua sobrevivência (Sprent, 1988). Se for este o caso, o tamanho da população deverá flutuar ao longo do ano numa frequência que se correlacionará com as condições ambientais.

A diferença de tolerância observada nos isolados obtidos no mesmo local (Elvas) em anos diferentes, talvez possa encontrar explicação nos diferentes conteúdos hídricos dos solos em cada um dos isolamentos. Em 1997, o isolamento foi efectuado na última semana de Junho e em 1998, na segunda semana de Janeiro. Em Junho de 1997 a população de *Rhizobium* estaria, provavelmente, sob “stress” hídrico e as estirpes mais tolerantes a esta condição seriam mais abundantes do que as sensíveis. No Inverno (Janeiro de 1998) a capacidade de tolerar a secura não é uma característica selectiva tão importante como no Verão. O maior conteúdo hídrico do solo proporcionou o aumento do número de indivíduos mais adaptados às novas condições ambientais existentes e que não incluíam escassez de água no solo.

De um modo geral, considera-se que o *Rhizobium* tolera melhor a salinidade do que as espécies pertencentes à família Leguminosae (Francois e Maas, 1994; Brewing *et al.*, 1993). No entanto, a maioria das estirpes de *Rhizobium* que nodulam as culturas de leguminosas economicamente mais importantes são muito sensíveis à salinidade (Bayoumi

et al., 1995). São frequentes os relatos dos efeitos inibitórios que a salinidade causa no crescimento de *Rhizobium*. Velagaleti e Schweitzer (1994) diferenciaram a tolerância salina de duas estirpes de *Bradyrhizobium* com base no crescimento a 80 mM NaCl. Elsheikh e Wood (1990) seleccionaram estirpes de *Rhizobium fredii* e *Bradyrhizobium japonicum* e verificaram que apenas uma cresceu a 340 mM NaCl. O crescimento da maioria das estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* diminuiu rapidamente quando a concentração de NaCl aumentou de 0 para 0,8% (Chien *et al.*, 1992; Bayomi *et al.*, 1995). Mas, são vários os autores que referem estirpes de *Rhizobium* capazes de sobreviver e crescer em meios com concentrações salinas próximas da água do mar (Melchor Marroquin *et al.*, 1999; Balasubramanian e Sinha, 1976; Chien *et al.*, 1992; Singleton *et al.*, 1982; Mohammad *et al.*, 1989^b; 1989^c; Mohammad *et al.*, 1991). Também neste capítulo se obtiveram isolados tolerantes às concentrações descritas e até superiores. Dos 60 isolados obtidos em Elvas, 26,6% toleraram concentrações de sal próximas da água do mar e 21,7% cresceram em meio com 1 M de NaCl. Zahran *et al.* (1994) também isolaram *Rhizobium* com tolerância salina a 1,7 M NaCl. O “stress” hídrico que a microflora suporta, pelo menos durante parte do ano, não deverá ser alheio aos resultados obtidos. Frequentemente, as respostas à seca e à salinidade são paralelizadas (Yeo, 1994; Mohammad, 1989^c), possivelmente porque alguns dos mecanismos envolvidos na tolerância ao “stress” hídrico, como por exemplo o ajuste osmótico, também contribuem para a tolerância à salinidade. Talvez por esse motivo, Bordeleau e Prevost (1994) refiram que o rizóbio isolado de solos áridos seja capaz de nodular leguminosas sob condições de seca e de salinidade e Mohammad *et al.* (1989c) e Cordovilla *et al.* (1999^a; 1999^b) tenham utilizado estirpes de *Rhizobium* tolerantes ao sal para nodular plantas de *Medicago sativa*, *Vicia faba* e *Pisum sativum* submetidas a “stress” hídrico. Mohammad *et al.* (1989^c) aconselham a introdução de *Rhizobium* tolerante ao sal em solos afectados pela seca como modo de melhorar a produtividade destas áreas e concluem que o potencial osmótico induzido pelo “stress” salino também desempenha um papel importante na selecção de tolerância à secura, uma vez que os dois tipos de “stress” andam habitualmente associados.

As diferenças de tolerância salina evidenciadas pelos isolados poderão dever-se à variação genética contida em plasmídios (Moënne-Loccoz e Weaver, 1995). Para além dos plasmídios que contêm genes ligados à simbiose, as estirpes de *Rhizobium* podem conter

mais um a dez plasmídios, muito estáveis, assumindo-se que desempenham papéis benéficos quando em vida livre (Hashem e Kuykendall, 1994). De facto, a comparação do perfil plasmídico de isolados e estirpes com diferentes tolerâncias salinas embora, *per se*, não consiga justificar a diferença de tolerância observada, mostra existir algum paralelismo entre a halotolerância e a presença de certos plasmídios (Figueira e Caldeira, dados não publicados).

4.2 Eficiência da simbiose entre *Pisum sativum* e *Rhizobium*

A eficiência da simbiose entre uma leguminosa e o microssimbionte está dependente de vários factores abióticos, como a temperatura, o pH, a disponibilidade hídrica ou a salinidade. Mas, sob as mesmas condições ambientais, estirpes diferentes evidenciam eficiências de fixação distintas quando colonizam o mesmo hospedeiro (Velagaleti e Marsh, 1990); Velagaleti e Cline, 1995; Elsheikh e Wood, 1990; Mohammad *et al.*, 1989^c; Abd-alla *et al.*, 1998, Phillips, 1980). Também neste capítulo, a inoculação de plantas de *Pisum sativum* ‘Resal’ por diferentes isolados e estirpes de *Rhizobium leguminosarum* evidenciaram diferenças no crescimento da parte aérea. Segundo Somasegaran e Hoben (1994), o conteúdo em azoto total correlaciona-se bem com o peso seco da parte aérea e fornece uma base aceitável para a comparação da eficiência de diferentes estirpes. Assim, o aumento significativo no crescimento da parte aérea, proporcionado pela inoculação com os isolados NI-1, NI-2, NI-3 e SB2-6, poderá traduzir a maior eficiência de fixação destes isolados, disponibilizando maior quantidade de azoto para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Dos quatro isolados mencionados, três cresceram em soluções com 400 mM de NaCl, o que possibilita a sua sobrevivência em solos afectados pela salinidade e aumenta a probabilidade do estabelecimento de uma simbiose efectiva sob concentrações salinas toleradas pelo simbiote mais sensível, ou seja, por *Pisum sativum*. A capacidade de seleccionar estirpes de *Rhizobium* tolerantes a vários tipos de “stress” ambiental, como a acidez, a seca e a salinidade, já foi conseguida em diversos trabalhos (Phillips, 1991; Mohammad *et al.*, 1991; 1989b; 1989c; Bayoumi *et al.*, 1995). Estes factos são indicativos de que a variação genética natural em *Rhizobium* é suficientemente grande para ser usada como base de selecção de estirpes apropriadas para tipos particulares de solos.

5. Conclusões

A tolerância salina das populações de *Rhizobium* são o reflexo das condições do *habitat* que ocupam e evidenciaram a adaptação ao meio ambiente que colonizam, com excepção, talvez, da população da Costa Nova.

Apenas os isolados de *Rhizobium* provenientes de um local que durante parte do ano está sujeito a “stress” hídrico evidenciaram tolerância à salinidade, possivelmente porque as adaptações à secura lhes conferem, simultaneamente, tolerância à salinidade. A tolerância de *Rhizobium* aos dois tipos de “stress” ambiental, salino e hídrico, foi já referido por Mohammad *et al.* (1989^c) e por Bordeleau e Prevost (1994). O estudo da tolerância salina dos isolados provenientes dos restantes locais revelou a sua sensibilidade, indicando que estão desprovidos dos mecanismos que lhes conferem tolerância ao sal. De facto, a comparação dos perfis plasmídicos de isolados com diferentes tolerâncias salinas, embora não consiga, *per se*, justificar a diferença de tolerância observada, mostrou alguma correlação entre a halotolerância e a presença de certos plasmídios (Figueira e Caldeira, dados não publicados).

Os resultados da avaliação da eficiência da simbiose entre alguns isolados ou estirpes de *Rhizobium* e plantas de *Pisum sativum* ‘Resal’ abriu boas perspectivas para o estabelecimento de uma simbiose efectiva sob condições de salinidade moderada porque os três isolados que proporcionaram maior crescimento da parte aérea toleraram salinidades de 400 mM. Se a este facto se somar a maior tolerância salina evidenciada por ‘Resal’ (capítulo II), então as probabilidades de se obter uma simbiose efectiva a concentrações de NaCl toleradas pelo simbionte mais sensível, *Pisum sativum*, deverão ser bastante razoáveis.

6. Bibliografia

-- Phillips (1980).

-- Balasubramiam e Sinha (1976)

Bayomi H.E.*F., Borbála B. e Kecskés M. (1995). Some environmental factors influencing the survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Acta Biologica Hungarica*, **46**: 17-30.

Bordeleau L.M. e Prévost D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, **161**: 115-125.

Caetano-Anollés G., Lagares A e Favelukes G. (1989). Adsorption of *Rhizobium melilotu* to alfalfa roots: dependence on divalent cations and pH. *Plant and Soil*, **117**: 67-74

Chien C.T., Maundu J., Cavaness J. e Dandurand L.M. (1992). Characterization of salt-tolerant and salt-sensitive mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* strain C1204b. *FEMS Microbiology Letters*, **90**: 135-140.

Grierson W. (1995). Role of temperature in the physiology of crop plants: pre- and postharvest. In *Handbook of Plant and Crop Physiology*: 611-83, Pessarakli M. (ed.). Marcel Dekker, New York.

Jordan D.C. (1984). *Rhizobiaceae*. In M. Bergey's Manual of Systematic Bacterology, vol. I: 234-256, Krieg N.R. e Holt J.G. (eds.). The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Phillips D.A. (1991). Genetic enhancement of nitrogen fixation. In *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*: 408-428, Dilworth M.J. e Glenn A.R. (eds.). Elsevier, Amsterdam.

Singleton P.W., El-Swaify S.A. e Bohlool B.B. (1982). Effect of salinity of *Rhizobium* in legume inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**: 884-890.

-- Somasegan e Hoben (1994).

Steinborn J. e Roughley R.J. (1974). Sodium chloride as a cause of low numbers of *Rhizobium* in legume inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, **37**: 93-99.

Subba Rao N.S., Lakshmi-Kumari M., Singh C.S. e Magu S.P. (1972). Nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) under the influence of sodium chloride. *Indian Journal of Agricultural Science*, **42**: 384-386.

-- Tu (1981)

Yap S.F., Lim S.T. (1983). Response of *Rhizobium* sp. UMKL 20 to sodium chloride “stress”. *Archives of Microbiology*, **135**: 224-228.

--Zaharan et al, 1994

Capítulo IV

Tolerância salina de *Pisum sativum* L.: influência da nutrição azotada

1. Introdução

A tolerância à salinidade poderá ter diferentes acepções consoante os objectivos com que é avaliada. Se a tolerância for encarada numa perspectiva ecológica, o mais relevante é a espécie conseguir competir com as restantes que colonizam o mesmo *habitat*, de modo a terminar o seu ciclo de vida e criar condições para a sua permanência. Do ponto de vista agrícola, o mais importante é a produtividade. Se a salinidade causar efeitos tóxicos e desequilíbrios osmóticos e nutricionais, levando a que uma grande parte dos fotossintetizados sejam usados como solutos osmóticos ou na exclusão de iões, ocorrerão reduções no crescimento e na produtividade que comprometerão o seu cultivo em solos agrícolas salinizados.

1.1 Crescimento vegetal sob “stress” salino

As plantas adquirem os nutrientes minerais a partir do solo e são, por isso, grandemente afectadas pelas suas características. A maioria das plantas cultivadas são glicófitas e evoluíram sob condições de baixa salinidade no solo. Em consequência, desenvolveram

mecanismos de absorção de nutrientes minerais em solos não salinos, sendo frequentemente incapazes de se desenvolverem neste tipo de ambiente sem evidenciarem danos.

O crescimento vegetativo e a produtividade envolvem o efeito integrado de várias componentes ambientais e de processos metabólicos que agem, com intensidade variável, ao longo do ciclo de vida da planta. O primeiro problema que as plantas têm de ultrapassar, quando se desenvolvem num meio adverso, é o de se estabelecerem. O estabelecimento só é possível se as plantas desenvolverem uma boa capacidade fotossintética de modo a produzirem biomassa suficiente que permita o seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Manter a capacidade fotossintética também poderá constituir um problema quando as plantas se desenvolvem sob condições inadequadas, como as que são propiciadas pela salinidade.

A salinidade é caracterizada por uma proporção excessiva de iões, na maioria das vezes Na^+ e Cl^- , na presença dos quais as plantas têm dificuldade em desenvolver-se.

Sob condições salinas, os três principais constrangimentos provocados pela salinidade no crescimento são o déficit hídrico que se origina no baixo potencial hídrico do meio radicular, a toxicidade iónica associada com a absorção excessiva de Cl^- e Na^+ e os desequilíbrios nutricionais devidos à diminuição da absorção e/ou do transporte para a parte aérea bem como da distribuição alterada dos nutrientes minerais (Marschner, 1995).

A diminuição da turgescência causada pela falta de regulação osmótica da parte aérea, onde é evitada a acumulação de Na^+ , é considerado como o principal factor responsável pela inibição do alongamento foliar conduzindo à diminuição da área foliar. O déficit hídrico causa o fecho parcial dos estomas, devido à perda de turgescência das células do mesófilo. Esta situação, frequentemente originada pela acumulação de iões no apoplasto, ocorre devido à baixa absorção iónica e/ou à sua exclusão das células do mesófilo. A acumulação de iões no apoplasto causa a diminuição do seu potencial osmótico, com a consequente saída de água das células, desidratação e perda de turgescência celular. A sequência destes acontecimentos é designada por “efeito de Oertli”(Oertli, 1968) e tem como consequência os iões sódio serem mais prejudiciais quando se encontram no apoplasto do que quando estão no citosol (Flowers e Yeo, 1986; Flowers *et al.*, 1991). O encerramento prolongado dos estomas causa reduções consideráveis na fixação de CO_2 por área foliar e por planta. (Marschner, 1995). O aumento da respiração e a menor duração

das folhas também contribuem para a diminuição do rendimento fotossintético (Yeo, 1998). De facto, são muitos os estudos que mostram ocorrer perda de capacidade fotossintética nas plantas sujeitas a “stress” salino (Below, 1995; Marschner, 1995; Yeo, 1994; Yeo 1998). A diminuição de fotossintetizados produzidos e o acréscimo dos dispêndios energéticos com a exclusão, compartimentação, excreção, ajuste osmótico ou reparação de danos celulares causados pela salinidade, contribuem para a diminuição do crescimento das plantas sob “stress” salino (Marschner, 1995).

Contudo, são também efeitos de natureza essencialmente osmótica que fazem com que o sódio estimule o crescimento das plantas que não o excluem da parte aérea. A acumulação de Na^+ nos vacúolos pode substituir o papel do potássio na regulação osmótica e, conseqüentemente, originar o aumento da turgescência e da expansão celular, podendo, neste aspecto, suplantar o K^+ se as concentrações vacuolares de Na^+ forem mais elevadas que as de K^+ (Jeschke, 1977; Nunes *et al.* 1984).

As concentrações excessivas de solutos inorgânicos, em especial Na^+ e Cl^- absorvidos pelas raízes a partir de meios salinizados também afectam o crescimento vegetal de forma directa. Os iões podem exercer efeitos negativos no crescimento das plantas, por toxicidade de iões acumulados acima de determinados valores, inibindo o crescimento e as funções metabólicas. São muitos os estudos que referem a inactivação enzimática *in vitro* e *in vivo* pela presença de concentrações salinas superiores a 100-150 mM NaCl (Greenway e Munns, 1980; Yeo, 1998). Esta inactivação ocorre, quer em plantas glicófitas, quer em plantas halófitas (Billard e Boucaud, 1980; Greenway e Osmond, 1972; Greenway e Munns, 1980; Yeo, 1998), evidenciando que a halotolerância não é uma consequência da adaptação da “maquinaria” metabólica à presença de concentrações elevadas de iões Na^+ e Cl^- no citoplasma, mas do sequestro destes iões em compartimentos celulares nos quais são minimizados os danos provocados no metabolismo celular. Em casos severos de toxicidade as plantas apresentam não só diminuição do crescimento, mas também cloroses e necroses marginais em folhas adultas. Com o tempo ou com o aumento da salinidade, as áreas danificadas aumentam e pode sobrevir a morte do órgão ou do indivíduo.

Entre os vários factores que contribuem para o crescimento das plantas, a disponibilidade de nutrientes desempenha um papel vital. No entanto, nos locais de absorção estes podem simultaneamente interagir sinérgica ou antagonisticamente. A disponibilidade de nutrientes e a sua absorção está relacionada com a actividade do nutriente iónico na

solução do solo. É geralmente aceite que os elementos inorgânicos regulam o metabolismo vegetal por integrarem moléculas orgânicas ou por agirem como cofactores e/ou activadores de várias enzimas. A sua disponibilidade para o crescimento vegetal é influenciada por factores bióticos e abióticos, pela sua interacção e pelas suas taxas de absorção. Muitos dos elementos são absorvidos ou excretados activamente, para o que é necessária energia fornecida, maioritariamente, pela respiração aeróbia que ocorre na raiz, à custa da utilização de hidratos de carbono e de O₂ (Velagaleti e Sweitzer, 1994).

Sob condições salinas o Na⁺ e/ou o Cl⁻ são, frequentemente, os iões mais abundantes, não sendo por isso de estranhar que estes solos sejam caracterizados por baixas actividades dos iões nutrientes e por razões elevadas de Na⁺/Ca²⁺, Na⁺/K⁺ e Cl⁻/NO₃⁻. Nestas condições, podem desenvolver-se desordens nutricionais e o crescimento das culturas pode reduzir-se.

1.2 Nutrição mineral sob salinidade

Como fronteira entre o interior e o exterior celular, a membrana plasmática é uma das mais importantes estruturas de que as células dispõem para regular a sua composição. As proteínas intrínsecas do plasmalema controlam quais os solutos que são acumulados e os que são excluídos, criando gradientes através da membrana. Este processo é importante em muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo a nutrição mineral. (Ward, 1997).

Alguns iões e solutos, como o H⁺, Na⁺ e Ca²⁺ são excluídos das células, enquanto que outros, como o K⁺, NH₄⁺, NO₃⁻, Cl⁻, SO₄²⁻, HPO₄⁻, açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos são acumulados. O transporte de cada um destes iões ou solutos é condicionado por proteínas membranares. De acordo com a sua função, estas proteínas são divididas em: bombas (ATPases iónicas e transportadores ABC), transportadores e canais iónicos (Heidrich e Schroeder, 1986; Marschner, 1995; Ward, 1997; Tanner e Caspari, 1996; Martinola *et al.*, 1993).

Uma das características fundamentais do transporte nas membranas vegetais é que os protões são excluídos activamente do citosol, para o exterior celular por P-ATPases e para o vacúolo, por V-ATPases e por V-pirofosfatases que hidrolizando o ATP ou o pirofosfato citosólico utilizam essa energia para a bombagem (Sussman, 1994). Deste modo, é criada a

força motriz que condiciona a absorção de cátions e aniões. Este processo cria um gradiente de pH, normalmente entre 1,5 e 2 unidades de pH (Marschner, 1995; Ward, 1997) e de voltagem, usualmente entre 100 e 200 mV (Marschner, 1995), 100 e 150 mV (Ward, 1997) no plasmalema. Em termos electrofisiológicos a absorção de cátions pode ocorrer de forma passiva, enquanto a absorção aniônica necessitará de energia.

A selectividade de canais iónicos e de transportadores, sendo baseada na carga e no raio iónico induz à competição de iões da mesma carga eléctrica. A competição entre o Cl^- e o NO_3^- , entre o K^+ e o Na^+ ou entre o Ca^{2+} e o Na^+ (Marschner, 1995; Tyerman, 1992; Fox e Guerinot, 1998) acarreta graves desequilíbrios nutricionais às plantas quando as razões destes iões são muito diferentes das que normalmente ocorrem na solução do solo.

1.2.1 Potássio

O potássio é o cátion mais abundante do citoplasma, com concentrações entre 100 e 200 mM (Leigh e Wyn-Jones, 1984), enquanto a concentração vacuolar pode variar entre 10 e 200 mM (Hsiao e Laüchli, 1986). As funções do K^+ na distensão celular bem como noutros processos originados pela turgescência estão relacionados com a concentração deste ião nos vacúolos. Nas suas funções osmóticas o K^+ é substituível por outros iões inorgânicos, como o Na^+ , o Mg^{2+} ou o Ca^{2+} ou por solutos orgânicos, como os açúcares ou os ácidos orgânicos. Mas o K^+ também tem importantes funções metabólicas. Um grande número de enzimas ou está completamente dependente ou é estimulado pelo K^+ .

Para o seu normal desenvolvimento as plantas necessitam de uma quantidade adequada de K^+ e uma vez que este nutriente se encontra frequentemente em concentrações baixas na solução do solo, as membranas plasmáticas das células radiculares desenvolveram mecanismos que permitem a diminuição da dependência das plantas das concentrações de K^+ do solo. Quando as concentrações externas de K^+ são elevadas, na ordem dos mM (Fox e Guerinot, 1998), o K^+ é absorvido por canais de baixa afinidade que permitem o rápido fluxo passivo a favor do gradiente electroquímico. Quando as concentrações de K^+ no exterior são baixas, entre 1 e 200 μM (Fox e Guerinot, 1998), a maioria do K^+ entra na célula por simporto ou antiporto com protões através de transportadores de elevada afinidade. Qualquer dos sistemas tem maior afinidade para o K^+ do que para o Na^+ , embora o grau de selectividade possa variar bastante inter e intra-especificamente (Gorham, 1990;

Grattan e Grieve, 1994). Em ambientes salinos, onde as concentrações de Na^+ na solução do solo são muito maiores do que as de K^+ , a competição desfavorece a absorção de K^+ , não só porque a sua quantidade relativa é menor mas também porque a selectividade do K^+ é diminuída por elevadas concentrações internas de Na^+ (Grattan e Grieve, 1994). Sob salinidade, a elevada selectividade do K^+ em relação ao Na^+ é mantida desde que o estado do Ca^{2+} seja mantido (Carter, 1983; Subbarao *et al.*, 1990) e desde que às raízes seja fornecido suficiente O_2 e energia (Drew *et al.*, 1988). Muitos estudos têm mostrado que a concentração de K^+ nos tecidos vegetais é reduzida à medida que a concentração de Na^+ ou a razão de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ da rizosfera aumenta (Kusanya e Ungar, 1984; Nakamura *et al.*, 1991; Subbarao *et al.*, 1990; Cramer *et al.*, 1985; Janzen e Chang, 1987). A maior tolerância salina evidenciada por algumas espécies ou cultivares está muitas vezes relacionada com a maior selectividade pelo K^+ que estas evidenciaram (Rathert, 1982; Grattan e Grieve, 1994).

1.2.2 Cálcio

O cálcio constitui cerca de 0,1 a 2,0 % do peso seco das plantas (Fox e Guerinot, 1998), mas a proporção pode ser muito maior, tendo já sido registados valores de 10% do peso seco de folhas adultas (Marschner, 1995). A concentração de Ca^{2+} livre no citosol é mantida próxima de 0,1 mM (Kauss, 1987; Fox e Guerinot, 1998) por uniporto, através de canais iónicos específicos (Kauss, 1987; Marschner, 1995; Barla e Pantoja, 1996), antiporto com protões, através de transportadores específicos (Fox e Guerinot, 1998;) ou por bombas de Ca^{2+} (Fox e Guerinot, 1998; Kauss, 1987), situadas nas membranas celulares e que originam concentrações vacuolares e extracelulares mais elevadas. Uma proporção elevada de Ca^{2+} total encontra-se ligada às paredes celulares, em especial à lamela média (Marschner, 1995) ou a fosfolípidos e proteínas das membranas estabilizando a sua estrutura e aumentando a sua selectividade (Kauss, 1987), como por exemplo de ATPases. (Marschner, 1995). Mas a maior parte do Ca^{2+} solúvel encontra-se nos vacúolos, onde poderá contribuir para o equilíbrio entre catiões e aniões actuando como contra-íão de aniões inorgânicos ,como o Cl^- ou o NO_3^- ou orgânicos, como o malato ou o oxalato (Marschner, 1995; Kauss, 1987). O papel do Ca^{2+} no aumento da tolerância salina das plantas está bem documentado (Ballaster *et al.*, 1997; Cachorro *et al.*, 1994, Greenway e

Munns, 1980, Banuls *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1993; Salomon *et al.*, 1989). Assim como a indução de deficiência em Ca^{2+} nas plantas a crescer sob “stress” salino (Martinez e Cerda, 1989; Gerald, 1971; Suarez e Grieve, 1987; Maas e Grieve, 1987; Lynch e Läuchli, 1985). Concentrações elevadas de Na^+ no substrato inibem a absorção e o transporte de Ca^{2+} e podem, por isso, induzir a deficiência em cálcio em plantas a crescer em substratos com baixas concentrações de Ca^{2+} ou com razões $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ elevadas (Lynch e e Läuchli, 1985; Läuchli, 1990). Devido ao Ca^{2+} ser facilmente deslocado dos seus locais de ligação extracelular por outros iões, estas funções podem ser gravemente prejudicadas pela diminuição da disponibilidade de Ca^{2+} . O crescimento e as funções radiculares podem ser gravemente restringidas por proporções elevadas de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A presença de suficiente Ca^{2+} nas soluções salinas é essencial para prevenir a acumulação de níveis tóxicos de Na^+ , uma vez que a sua absorção e exclusão são fortemente regulada pelo Ca^{2+} (Gerald, 1971; Läuchli, 1990; Grattan e Grieve, 1994). Cramer *et al.* (1985; 1987) concluíram que a resposta principal ao “stress” de NaCl em raízes do algodoeiro é o deslocamento do Ca^{2+} associado às membranas pelo Na^+ , conduzindo ao aumento da permeabilidade e à perda da selectividade do K^+/Na^+ membranas. Colmer *et al.* (1996) descobriram que o fornecimento suplementar de Ca^{2+} mitigou a inibição do crescimento induzida pelo NaCl em raízes de *Sorghum bicolor* através da manutenção da selectividade pelo K^+ em relação ao Na^+ . A adição de Ca^{2+} na concentração de 10 mM a culturas salinas preservou a integridade das membranas e impediu a saída de K^+ intracelular. A selectividade das raízes pelo Ca^{2+} é muito maior do que pelo Na^{2+} , no entanto, à medida que a actividade do Na^+ aumenta no substrato, o sistema torna-se menos discriminatório e diminui a selectividade pelo Ca^{2+} (Suarez e Grieve, 1993). O fornecimento de 5mM de Ca^{2+} a plantas de *Phaseolus vulgaris* ‘Contender’ permitiu-lhes manter o crescimento através da exclusão mais eficiente do Na^+ da parte aérea. A regulação osmótica das folhas foi feita à custa de K^+ e Cl^- , evitando a síntese de solutos orgânicos energeticamente dispendiosos (Ballaster *et al.*, 1997). O aumento da concentração de Ca^{2+} pode fazer aumentar bastante o crescimento, diminuir a absorção de Na^+ , não alterar a absorção de K^+ e evitar a deficiência em Ca^{2+} , como observado em *Oryza sativa* (Marschner, 1995), *Gossypium hirsutum* L., *Sorghum bicolor* L. ou *Phaseolus vulgaris*, embora em algumas espécies este efeito possa não ser observado.

1.2.3 Magnésio

Nos tecidos vegetais a concentração de Mg^{2+} é da ordem de alguns mM. Mas, apenas menos de 1mM se encontra livre no citoplasma (Yazaki *et al.*, 1988). A maioria do Mg^{2+} encontra-se ligado às paredes celulares, a moléculas de ATP ou incorporado em moléculas de clorofila.

É longa a lista de enzimas que requerem ou são fortemente promovidas pelo Mg^{2+} . A maioria das reacções dependentes do Mg^{2+} envolvem a transferência de fosfato (fosfatases e ATPases) ou de grupos carboxílicos (carboxilases). Enzimas que estão fortemente envolvidas na absorção iónica e na sua assimilação (Marschner, 1995).

A taxa de absorção do magnésio é fortemente inibida por outros catiões, como o K^+ , o NH_4^+ (Kurvits e Kirkby, 1980), o Ca^{2+} (Grattan e Grieve, 1994), o Mn^{2+} (Heenan e Campbell, 1981) e, possivelmente, o Na^+ . Todos estes catiões competem com o magnésio pelos locais de ligação existentes nas membranas plasmáticas (Marshner, 1995)

1.2.4 Fósforo

Para um crescimento óptimo as necessidades de fósforo caem no intervalo de 0,3 a 0,5 % do peso seco da planta durante a fase de crescimento vegetativo. O fósforo não é reduzido nas plantas permanecendo na sua forma oxidada HPO_4^{2-} ou $H_2PO_4^-$ (dependendo do pH), livre como fosfato inorgânico ou incorporado em compostos orgânicos (ATP, açúcares, proteínas, ácidos nucleicos, ou lípidos). Nas células a concentração de Pi é de alguns mM mas o citosol contém menos de 1 mM livre, encontrando-se a maior parte no vacúolo, que age como armazém de fosfato inorgânico. Nas folhas, o conteúdo em Pi pode variar grandemente (5mM a 0,2 mM) sem causar danos na fotossíntese (Minura *et al.*, 1990). Estas variações ocorrem principalmente nas concentrações vacuolares e estão dependentes da disponibilidade exterior deste anião. Em plantas com um adequado fornecimento de Pi, os vacúolos contêm frequentemente 85 a 90% da quantidade total deste ião. Enquanto, em plantas deficientes em fósforo quase todo o Pi se encontra no citoplasma e nos cloroplastos (Foyer e Spencer, 1986).

A interacção entre a salinidade e a nutrição fosfatada está muito dependente da espécie e mesmo da cultivar sob estudo, da idade, do nível de “stress” e da concentração de fosfato no substrato. Têm sido descritos aumentos, bem como diminuições de fósforo nos tecidos de plantas a crescer em “stress” salino, embora o aumento seja mais frequente (Champagnol, 1979). Em estudos efectuados com culturas hidropónicas a salinidade aumentou o Pi nos tecidos, talvez porque as suas concentrações são muito mais elevadas nestas condições de cultura do que no campo, por exemplo 2mM contra 2?M respectivamente (Aswad *et al.*, 1990; Grattan e Grieve, 1994). Nos três estudos mencionados a salinidade aumentou a acumulação de fósforo nas plantas quando a solução de nutrientes continha níveis elevados de fosfatos. As mudanças que causam o aumento da absorção de Pi, apesar da diminuição da sua actividade devida à presença da salinidade, não é referida na literatura.

1.2.5 Sulfato

A quantidade de enxofre necessária para um crescimento óptimo varia entre 0,1 e 0,5% do peso seco (Marschner, 1995). Esta variação reflecte o conteúdo em enxofre das sementes, que no caso das leguminosas varia entre 0,25 e 0,3% do peso seco. A grande maioria do sulfato é absorvida radicularmente a taxas relativamente baixas por simporto com protões através de transportadores localizados na membrana plasmática na forma de ião divalente SO_4^{2-} . A absorção de SO_4^{2-} não é afectada pela presença de outros aniões, com excepção do SeO_4^{2-} que compete pelos locais de ligação nos mesmos transportadores (Robson e Pitman, 1983). O sulfato tem primeiro de ser reduzido (S_2^-), tal como o NO_3^- , antes de ser incorporado em coenzimas e aminoácidos. No entanto, o enxofre é incorporado em sulfolípidos na forma oxidada.

Cerca de 2% do enxofre reduzido encontra-se dissolvido, a grande maioria na forma de glutathiona (tripéptido). Esta molécula é um poderoso antioxidante e em conjunto com o ascorbato desempenham um papel importante na eliminação de radicais de oxigénio e de peróxido de hidrogénio (Marschner, 1995). Este mecanismo é especialmente importante nos nódulos das leguminosas onde as concentrações de oxigénio têm de ser mantidas na ordem de algumas dezenas de nM (Vance e Gantt, 1992), de modo a manter a actividade das nitrogenases.

Nas leguminosas a deficiência em enxofre causa, no início do desenvolvimento vegetativo, a diminuição da actividade das nitrogenases, tornando os sintomas indistintos dos causados pela deficiência em azoto. Durante o desenvolvimento reprodutivo, a deficiência em enxofre não só diminui o conteúdo total de proteínas, mas também o seu conteúdo em enxofre, alterando o seu valor nutricional (Marschner, 1995).

1.2.6 Azoto

O azoto é o quarto elemento mais abundante dos seres vivos, constituindo cerca de 1,5 a 5% do peso seco das plantas (Below, 1995). Devido às elevadas necessidades deste elemento, cerca de 70% dos iões absorvidos pelas plantas são azotados. (Marschner, 1995). Entre os elementos nutrientes minerais, o azoto limita, frequentemente, o crescimento e a produtividade em culturas que não sejam leguminosas. O azoto é incorporado em numerosos compostos orgânicos que incluem proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas e reguladores de crescimento, desempenhando todos eles papéis cruciais no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Ao contrário dos restantes nutrientes, as plantas podem absorver o azoto sob duas formas iónicas diferentes: o anião NO_3^- ou o catião NH_4^+ . Sob condições naturais, o azoto entra no ambiente do solo como resultado da fixação biológica, ou por decomposição animal e vegetal. A grande maioria (mais de 90%) do azoto presente nos solos está contido na matéria orgânica, que é relativamente estável e não está directamente disponível para as plantas (Below, 1995). Uma parte do azoto orgânico pode, no entanto, tornar-se disponível através da mineralização por microrganismos presentes no solo.

Em solos quentes e bem arejados dois géneros de bactérias quimioautotróficas, *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, oxidam rapidamente o NH_4^+ em NO_3^- (nitrificação). A forma de azoto fornecida, catião ou anião, afecta a sua disponibilidade para as plantas devido a diferenças de mobilidade de cada forma na solução do solo. O catião NH_4^+ liga-se a partículas de solo carregadas negativamente e torna-se relativamente imóvel. Pelo contrário, o anião de NO_3^- é repellido, o que ajuda o seu movimento em direcção às raízes. No entanto, esta forma de azoto é perdida com mais facilidade por lixiviação e por desnitrificação (Bray, 1983; Below, 1995).

As plantas adquirem a grande maioria do seu azoto através do sistema radicular. Este processo envolve o movimento de azoto inorgânico, NO_3^- ou NH_4^+ , através da membrana plasmática. Devido à diferença de carga, os mecanismos da absorção radicular de NO_3^- e de NH_4^+ diferem. A absorção de NO_3^- exhibe um padrão bifásico, com um período inicial onde a absorção é muito reduzida, seguido de um aumento exponencial da absorção (Goyal e Huffaker, 1986). O sistema de absorção de NO_3^- é dinâmico e capaz de se ajustar a alterações dos níveis de NO_3^- no ambiente que circunda a raiz. A absorção de NO_3^- é um processo activo que tem de ultrapassar um gradiente electroquímico desfavorável entre a solução exterior e o simplasto da raiz. Em contraste com o NO_3^- , a absorção do NH_4^+ é feita passiva e activamente. Os dois processos devem ocorrer por diferentes mecanismos. No processo passivo os catiões de amónio entram por uniporto seguindo o gradiente electroquímico existente através do plasmalema (Ulrich *et al.*, 1984). O mecanismo de absorção activa de NH_4^+ parece ser regulado por transportadores (Goyal e Huffaker, 1986). Outra diferença importante entre a absorção de NO_3^- e de NH_4^+ é a sensibilidade ao pH. A absorção máxima de NH_4^+ ocorre a pH próximo da neutralidade e é diminuída à medida que o pH baixa (Rao e Rains, 1976; Magalhães e Huber, 1989; Vessey *et al.*, 1990). Este problema é agravado pela acidificação da rizosfera associada à absorção de NH_4^+ . Pelo contrário, a absorção de NO_3^- é máxima a valores de pH entre 4 e 5, diminuindo a valores mais elevados (Rao e Rains, 1976), e a alcalinidade gerada pela absorção de NO_3^- poderá restringir, posteriormente a sua absorção.

Enquanto o NH_4^+ pode ser directamente utilizado na síntese de aminoácidos, o NO_3^- tem primeiro de ser reduzido a NH_4^+ . A redução é um processo que depende energia e ocorre por duas reacções principais. A primeira, que envolve a redução do NO_3^- em NO_2^- é catalizada pela enzima redutase do nitrato. A segunda é catalisada pela enzima redutase do nitrito.

O azoto diatómico é uma molécula muito pouco reactiva, sendo um gás inerte para as células eucariotas, que não dispõe de “maquinaria” bioquímica para reagir com ele. Apenas alguns procariontes, que incluem espécies dos géneros *Azotobacter*, *Azotococcus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Azolla*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Frankia*, desenvolveram enzimas que reduzem o N_2 (Bray, 1983; Marschner, 1995). Alguns dos quais estabeleceram endossimbioses, como é o caso da associação entre plantas da família Leguminosae e de bactérias do género *Rhizobium*.

Rhizobium encontra-se normalmente nos solos em vida livre não fixando N_2 , função que desempenha apenas em associação com o hospedeiro. As bactérias colonizam as raízes das plantas no início do crescimento vegetativo. O processo inicia-se com o reconhecimento do hospedeiro pela bactéria, o que cria uma certa especificidade na simbiose entre a espécie de leguminosa e a espécie ou mesmo biovariedade do microssimbionte e termina-se na formação do nódulo (Brewing, 1993; Marschner, 1995; Bray, 1983). A região central do nódulo é constituída por células invadidas ou não por bactérias, rodeada por uma zona periférica vascularizada de células corticais não infectadas. As bactérias sofrem alterações estruturais (como a perda de parede) e metabólicas (como a expressão das nitrogenases) que lhes permitem fixar o N_2 , transformando-se em bacteroides (Brewing *et al.*, 1993). Cada bacteroide está individualmente ou em pequenos grupos, rodeado por uma membrana, formando uma estrutura denominada o simbiossoma onde ocorre a fixação de N_2 .

O complexo de nitrogenases consiste em duas componentes, I e II. A componente I é maior (218kDa) e contém o local de redução do N_2 . Esta componente é constituída por quatro subunidades de dois tipos diferentes (59 kDa e 51 kDa) e tem dois cofactores que contêm Mo e Fe. Os cofactores parecem fazer parte do centro activo da enzima e são muito sensíveis à oxidação (Brewing, 1993). A componente II fornece os electrões que reduzem a componente I, contém um grupo de quatro iões de Fe e quatro de S. Após a redução da componente II por um electrão, as duas componentes associam-se com doação do electrão à componente I numa reacção que é acoplada à hidrólise de Mg^{2+} ATP. Os dois complexos dissociam-se e são necessários vários destes ciclos para fixar uma molécula de N_2 com produção de duas moléculas de NH_3 e gasto de ATP. A enzima é pouco específica para o N_2 e pode também reduzir outros substratos. A redução do acetileno com produção de etileno é frequentemente usada como medida da actividade do complexo de nitrogenases. Este processo é considerado energeticamente dispendioso, pois os nódulos podem consumir cerca 16 a 43% dos açúcares, maioritariamente sacarose, fornecidos à raiz. (Harvey, 1977; Brewing *et al.*, 1993; Bray, 1983).

O NH_4^+ resultante da redução do NO_3^- , da fixação simbiótica do N_2 , ou absorvido directamente é assimilado pelo ciclo de síntese do glutamato, que envolve duas reacções que ocorrem sucessivamente e que são catalizadas pelas enzimas sintetase da glutamina (GS) e do glutamato (GOGAT). Na primeira reacção o NH_4^+ é incorporado em glutamina

pela GS. A segunda reacção, catalizada pela GOGAT transfere o grupo -NH_2 da glutamina para o 2-oxo-glutarato formando duas moléculas de glutamato. Seguem-se uma série de reacções semelhantes mediadas por transaminases específicas que transferem o grupo amino (-NH_2) do glutamato para o grupo 2-oxi de um 2-oxoácido. A modificação bioquímica do glutamato, da glutamina e o conjunto de aminoácidos produzidos pelas reacções de transaminação geram os cerca de vinte aminoácidos que são a matéria prima da síntese proteica e cuja anabolização gera uma série de outros compostos, como sejam clorofilas, reguladores de crescimento e ácidos nucleicos (Below, 1995)

A produtividade das plantas exclusivamente dependentes da fixação de N_2 será, certamente, menor do que naquelas onde é fornecido azoto inorgânico devido aos maiores custos energéticos que este tipo de nutrição azotada acarreta, mas tem a vantagem de libertar as plantas da dependência do azoto disponível no solo para o seu crescimento e desenvolvimento.

Cerca de 70% dos iões absorvidos pelas plantas são azotados (Marschner, 1995), evidenciando a importância que a forma do azoto fornecida às plantas (NO_3^- , NH_4^+ ou N_2 fixado) desempenha nas relações entre catiões e aniões.

As plantas nutridas com NH_4^+ são caracterizadas por uma razão elevada de absorção de catiões/aniões, acontecendo o contrário às plantas nutridas com NO_3^- . Assim, nas primeiras a absorção dos restantes aniões é favorecida e a dos restantes catiões desfavorecida em relação às segundas. Smart e Bloom(1998) observaram que a exposição de plantas de *Lycopersicon esculentum* ao amónio provocou a diminuição da absorção de K^+ e o aumento do efluxo de prótons para o apoplasto. Rufty *et al.* (1982) observaram em plantas de soja que a diminuição de pH de 6,5 para 5,1 resultou no aumento da razão de absorção de aniões sobre os catiões de 1,0 para 1,25. A absorção de NH_4^+ diminui o pH do citosol e do apoplasto, levando a que o potencial electroquímico através do plasmalema das células radiculares diminua. Dunlop e Bowling (1978) observaram variações de potencial eléctrico de -150 mV a pH 6 para -100 mV a pH 4, o que causa a diminuição da absorção de catiões. A melhoria da absorção total de catiões pelo Ca^{2+} está provavelmente relacionada com a sua função na manutenção da integridade da membrana plasmática. O efeito activador do Ca^{2+} nas P-ATPases ligadas ao plasmalema poderá ser um factor que contribui para facilitar a absorção de K^+ a baixos valores de pH através do funcionamento do contratransporte e do cotransporte $\text{K}^+\text{-H}^+$ (Marschner, 1995). A influência que o Ca^{2+} tem

na manutenção de razões K^+/Na^+ elevadas devido ao aumento da selectividade das membranas, realça o papel importante que o Ca^{2+} tem na manutenção das concentrações de K^+ e na diminuição da absorção de Na^+ em plantas a crescer sob “stress” salino. Sob condições salinas, a nutrição azotada sob a forma de NH_4^+ , estimula a absorção de Cl^- , aumentando a toxicidade associada à acumulação deste ião acima de determinados níveis (Marschner, 1995). Martínez e Cerdá (1989) repararam que a absorção de Cl^- em *Cucumis sativus* L. era estimulada quando metade do NO_3^- presente na solução era substituído por NH_4^+ .

Ao contrário do NH_4^+ , a absorção de NO_3^- aumenta o pH nos dois lados da membrana plasmática devido ao maior consumo de prótons do apoplasto no cotransporte através da membrana e à acumulação de aniões no interior da célula. Esta alteração de pH causa o aumento da absorção de catiões e a inibição da absorção de outros aniões. É frequente observar-se maiores conteúdos em K^+ nas plantas nutridas com NO_3^- do que naquelas onde o azoto é obtido outras formas (Marschner, 1995). Martínez e Cerdá (1989) notaram que quando o NO_3^- era a única fonte de azoto disponível, a acumulação de K^+ nas plantas aumentava sob condições salinas, quando o meio continha NO_3^- e NH_4^+ a acumulação de K^+ era reduzida. Efeitos semelhantes foram descritos para outras espécies (Feigin, 1990; Grattan e Grieve, 1994; Marschner, 1995).

A absorção de Cl^- é frequentemente inibida pelo NO_3^- (Marschner, 1995; Grattan e Grieve, 1994), não só devido à influência do pH, mas também à competição entre os dois aniões. Esta competição é de grande importância na tolerância à salinidade. O Cl^- pode prejudicar seriamente a nutrição azotada das plantas (Bernstein, 1974; Kafkafi *et al.*, 1982; Feigin *et al.*, 1987). O aumento do fornecimento de NO_3^- poderá ser um meio eficaz de melhorar o estado nutricional azotado das plantas a crescerem sob “stress” salino e, simultaneamente, aumentar a tolerância salina devido à menor acumulação de Cl^- que acima de determinadas concentrações se torna tóxico.

Quando ambas as formas de azoto, NO_3^- e NH_4^+ , são fornecidas o pH do citoplasma mantém-se equilibrado através de taxas de produção de H^+ (assimilação de NH_4^+) e de consumo de H^+ (assimilação de NO_3^-), havendo menores custos energéticos na manutenção dos valores de pH do citoplasma (entre 7,3 e 7,6), o que pode, pelo menos em parte, explicar que a maioria das espécies vegetais obtenha crescimentos óptimos quando lhes é

fornecida uma mistura destes dois íões azotados (Marschner, 1995; Grattan e Grieve, 1994).

São muitos os estudos que relatam o efeito inibitório que a salinidade tem na nutrição azotada de plantas dependentes do azoto fixado simbioticamente quando comparadas com plantas cujo azoto é fornecido sob forma inorgânica (Bernstein e Ogata, 1966; Lauter *et al.*, 1981; Yousef e Sprent, 1983; Cordovilla *et al.*, 1994; Cordovilla *et al.*, 1996; Lauter *et al.*, 1981; Singleton e Bohlool, 1984; Tu, 1981; Cordovilla *et al.*, 1999^a).

Em ambientes salinos a quebra na nodulação pode dever-se à diminuição da população de *Rhizobium*, devida à sensibilidade ao sal. No capítulo II, três das populações de *Rhizobium* compatível com *Pisum sativum* evidenciaram forte inibição de crescimento em meio de cultura suplementado com 50 mM NaCl. Elsheikh e Wood, (1995) seleccionaram estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* quanto à tolerância salina e observaram que uma delas só cresceu na ausência de NaCl, as restantes mostraram diferentes tolerâncias e só uma cresceu a 340 mM. Zharan *et al.* (1994) isolaram estirpes de *Rhizobium* com diferentes tolerâncias salinas, algumas crescendo em meio com 1,7M NaCl. No capítulo II, alguns dos isolados obtidos também evidenciaram este nível de halotolerância.

A inibição da nodulação pelo sal é tida mais como um efeito sobre o estabelecimento dos nódulos do que sobre a redução da população de *Rhizobium*. São vários os trabalhos que evidenciam o estabelecimento dos nódulos como o processo mais sensível à salinidade (Lakshimi-Kumari *et al.*, 1974; Bhladwaj, 1975; Balasubamian e Sinha, 1976; Wiegel *et al.*, 1973; Singleton e Bohlool, 1983; Bernstein e Ogata, 1968?; Lauter *et al.*, 1981; Cordovilla *et al.*, 1999^a). Singleton e Bohlool (1984) verificaram uma forte redução (50%) no número de nódulos presente em raízes de *Glycine max* a crescer sob 26,6 mM NaCl. Elsheikh e Wood (1990) observaram que a nodulação em *Cicer arietinum* L. foi completamente inibida a 61,6 mM NaCl, mesmo inoculando com uma estirpe tolerante ao sal. Abd-Alla *et al.* (1998) observaram que a salinidade (30 e 60 mM NaCl) inibiu a número e a biomassa dos nódulos de quatro cultivares de *Glycine max* inoculadas com uma estirpe de *Bradyrhizobium* tolerante ao sal. Mas esta susceptibilidade nem sempre foi verificada. Tu (1981) observou que o número de nódulos em plantas de *Glycine max* a crescer a 102 mM não diminuiu. A redução do número de nódulos tem sido associada à inibição que a salinidade provoca na expansão, no encurvamento e no número dos pêlos radiculares (Sprent e Zahran, 1986; Tu, 1981; Lakshimi-Kumari *et al.*, 1974).

A quebra dos níveis internos em azoto pode também ser devida à diminuição da eficiência da fixação, tendo sido lançadas várias hipóteses para explicar os efeitos negativos do sal na fixação de N₂: diminuição do fornecimento de fotossintetizados aos nódulos (Bekki *et al.*, 1987; Georgieva e Atkins, 1993); menor disponibilidade de compostos reduzidos aos bacteroides (Delgado *et al.*, 1993, 1994); alterações na barreira de difusão do oxigénio (Serraj *et al.*, 1994; Wahab e Zahran 1981); inibição de várias enzimas importantes na fixação e assimilação do N₂. Serraj *et al.* (1994) mostraram que a exposição de plantas de *Glycine max* a 0,1 M NaCl resultou numa diminuição rápida na actividade da nitrogenase. Abd-Alla *et al.* (1998) constataram que 30 mM eram suficientes para provocar a diminuição acentuada da actividade das nitrogenases em três das quatro cultivares de *Glycine max* utilizadas no estudo. Bourgeais-Chaillou *et al.* (1992) descreveram ocorrer a diminuição da actividade das sintetases da glutamina (GS) e do glutamato (GOGAT) nos nódulos radiculares. À mesma conclusão chegaram Cordovilla *et al.* (1996; 1999^a; 1999^b), mostrando que a actividade da NADH-GOGAT era mais inibida do que a da GS e concluíram que a primeira limitava a assimilação do amónio em nódulos de *Vicia faba* L. em “stress” salino. Noutros trabalhos, os mesmos autores (1994; 1999^c) concluem que a fixação do N₂ foi mais sensível à salinidade do que a assimilação do amónio.

Em plantas exclusivamente dependentes de N₂ fixado simbioticamente, a vulnerabilidade à salinidade aumenta porque a influência do “stress” salino sobre a fixação de N₂ é maior do que sobre a absorção de azoto inorgânico e porque os gastos energéticos do azoto adquirido por simbiose são maiores, restando menos energia disponível para o crescimento e para a adaptação à salinidade. A acumulação intracelular de solutos orgânicos nos nódulos, como a prolina ou a glicinabetaína, tem sido correlacionada com a tolerância salina (Robson e Bottomley, 1991; Botsford e Lewis, 1990). Um modo mais eficiente de conseguir tolerância salina será a de compartimentar subcelularmente os compostos inorgânicos nos vacúolos, evitando, deste modo, a toxicidade iónica (Zahran, 1991). A melhoria da compartimentação iónica nas células nodulares poderá promover o crescimento sustentado pela fixação de N₂ em condições de salinidade. Segundo Zahran (1991), este parece ser um bom critério de selecção de leguminosas para crescimento sob condições de salinidade.

Torna-se assim evidente a importância das espécies e das cultivares tolerantes ao sal no estabelecimento de uma simbiose efectiva sob “stress” salino. Todavia, a necessidade de

rizóbio tolerante ao sal não pode ser ignorada. Ao longo do tempo apenas o rizóbio tolerante ao sal consegue sobreviver e persistir em solos salinos. É indispensável que o solo contenha uma população de rizóbio compatível com a cultura pretendida e com dimensão suficiente para que se estabeleça uma simbiose efectiva quando as leguminosas são cultivadas em solos salinos.

1.3 Mecanismos de tolerância salina

A adaptação à salinidade envolve mecanismos que terão de aliviar os efeitos do *déficit* hídrico, da toxicidade iónica e do desequilíbrio nutricional.

Nas glicófitas, que compreendem a maioria das espécies agrícolas, existe, de um modo geral, uma relação inversa entre a absorção de sal e a tolerância salina (Greeway e Munns, 1980). De um modo geral, sustenta-se que a tolerância à salinidade das glicófitas assenta na capacidade de restringir ou de prevenir a entrada de Na^+ na parte aérea. É sobejamente conhecido que a salinidade retarda o crescimento vegetal devido à sua influência sobre vários processos vitais do metabolismo das plantas, que incluem o ajuste osmótico, a absorção de nutrientes, as sínteses proteica e de ácidos nucleicos, a fotossíntese, a acumulação de solutos orgânicos, a actividade enzimática, o equilíbrio hormonal, a alteração da taxa de transpiração e a redução da disponibilidade de água (Jacoby, 1994).

Os primeiros efeitos da salinidade sobre as plantas são de natureza osmótica. Bisson e Gutknecht (1980) descreveram a sequência de acontecimentos que ocorrem nas células vegetais sob salinidade exterior e diminuição do potencial hídrico. A primeira reacção é a saída de água da célula até que os potenciais hídricos dos dois lados da membrana se igualem, o que causa a diminuição de turgescência celular. A célula reage a esta diminuição de pressão interna, aumentando a quantidade de solutos, ocorrendo o influxo de água temporário até que os níveis de turgescência sejam recuperados. São vários os solutos orgânicos, principalmente glicinabetaína, prolina e açúcares, bem como os iões inorgânicos, em particular Na^+ , K^+ e Cl^- , que se acumulam nas plantas durante a regulação da turgescência.

O cloreto de sódio é abundante na maioria dos ambientes salinos. A acumulação de Na^+ e Cl^- nas células é pois uma solução energeticamente pouco dispendiosa para as células. De acordo com Wyn Jones (1981), o custo aproximado de acumular 1 mole de solutos é a

seguinte: absorção de uma mole de NaCl 0,54 moles ATP, acumulação de uma mole de hexoses 54 moles ATP, ou seja 100 vezes mais. Contudo, devido à sua toxicidade acima de determinadas concentrações citoplasmáticas (Yeo, 1994; Yeo, 1998), o uso de Na⁺ e Cl⁻ na regulação osmótica é limitado ao vacúolo. As enzimas extraídas de halófitas, mostram *in vitro*, idêntica sensibilidade halina às originárias de glicófitas (Flowers *et al.*, 1977 Greenway e Osmond, 1972, Greenway e Munns, 1980; Wyn-Jones, 1984; Flowers e Dalmond, 1992; Yeo, 1998).

A adaptação a ambientes salinos levou a que as plantas desenvolvessem mecanismos para anular os efeitos tóxicos provocados pelo sal. Uma estratégia que é seguida pela maioria das halófitas, a flora endêmica dos ambientes salinos, e até certo grau por algumas glicófitas, é a de regular a turgescência interna pela acumulação de Na⁺ e Cl⁻. Os íons ficam sequestrados nos vacúolos (Jeschke e Stelter, 1976; Jeschke, 1984; Hajibagheri e Flowers, 1989; Schachtman, 1991; Yeo, 1994; Greenway e Munns, 1980), que devido às suas dimensões, cerca de 90% do volume celular total, necessitam de grande quantidade de solutos para a sua regulação osmótica. O vacúolo permite à célula excluir substâncias do citoplasma quando a exclusão directamente para o exterior não é possível. Neste sentido, o citoplasma tem dois “exteriores” para os quais pode enviar substâncias prejudiciais ao seu normal funcionamento e as suas funções vitais têm de ser mantidas em relação quer ao vacúolo, quer ao exterior (Yeo, 1998). Nas halófitas os vacúolos das células contêm, frequentemente, 500 a 1000 mM NaCl, enquanto a concentração no citoplasma é mantida a 150 mM ou menos (Yeo, 1998). O equilíbrio osmótico do citoplasma ocorrerá à custa de solutos orgânicos mais dispendiosos do ponto de vista energético mas, devido ao seu pequeno tamanho, apenas 5 a 10% do volume celular (Flowers e Yeo, 1986; Yeo, 1988), são comportáveis à célula. Harvey *et al.* (1981) examinaram a compartimentação dos principais íons minerais em células foliares de *Suaeda maritima* (L.) Dumort a crescer em 350 mM NaCl e encontraram acumulações nos vacúolos de 565 mM de Na⁺ e 388 mM de Cl⁻. Enquanto, as concentrações destes íons no citoplasma eram 109 mM e 21 mM, respectivamente. A concentração de K⁺ era idêntica nos dois compartimentos 16 e 24 mM. A glicinabetaína apenas foi detectada no citoplasma a uma concentração que quase equilibrou osmoticamente este compartimento (87%) face às concentrações de Na⁺ e Cl⁻ detectadas no vacúolo. Na mesma espécie, Hajibagheri e Flowers (1989) encontraram

compartimentação idêntica do Na^+ nas raízes, 118 mM no citoplasma e 432 mM no vacúolo.

O transporte do sódio do ambiente externo para o citoplasma das células vegetais é um processo passivo, dependente do gradiente do potencial electroquímico nos dois lados do plasmalema e de neste existirem canais permeáveis ao Na^+ . Ainda não foi demonstrada a existência de canais específicos para o Na^+ nas membranas plasmáticas. Mas, uma vez que a permeabilidade das membranas ao Na^+ é muito maior do que a demonstrada por vesículas de bicamada lipídica artificiais, a permeabilidade terá de ser facilitada por canais catiónicos com diferentes permeabilidades para os vários catiões (Schachtman *et al.*, 1991). São vários os artigos que descrevem a permeabilidade ao Na^+ por canais catiónicos com pequena selectividade global (Amtmann *et al.*, 1997; Roberts e Tester, 1977; Tyerman *et al.*, 1997). Se estes canais catiónicos constituírem os principais pontos de passagem de Na^+ para o interior celular (Davemport *et al.*, 1977) então, sob condições salinas, a sua regulação aumentará a tolerância à salinidade. Como a função provável destes canais, sob condições não salinas, poderá ser a de facilitar a entrada de nutrientes, o seu encerramento acarretará alterações de nutrição às plantas que se desenvolvem sob salinidade e poderá não ser a solução mais apropriada para as plantas lidarem com o “stress” que lhes é imposto (Yeo, 1998). A um potencial eléctrico de -120 mV a concentração de Na^+ no citoplasma pode ser 100 vezes maior do que no exterior. Esta acumulação é evitada pelo controlo do influxo (fecho dos canais) e/ou pela exclusão activa para os vacúolos ou para o apoplasto (Barkla e Pantoja; 1996; Stall *et al.*, 1991). A capacidade das células acumularem Na^+ nos vacúolos pode ser alterada pelas condições ambientais. A salinidade aumenta, geralmente, essa capacidade (Barkla e Pantoja; 1996). Nas plantas, a força motriz do transporte activo de Na^+ para o vacúolo é criada pelo gradiente de prótons existente através do tonoplasto, gerado por V-pirofosfatases e por V-ATPases. Enquanto a actividade das V-pirofosfatases é, geralmente, diminuída pela salinidade (Bremberger e Lüttge, 1992; Matsumoto e Chung, 1988; Nakamura *et al.*, 1992) a actividade das V-ATPases é aumentada, possibilitando o aumento do transporte de Na^+ para os vacúolos. (Barkla *et al.*, 1995; Matsumoto e Chung, 1988; Nakamura *et al.*, 1992; Bremberger *et al.*, 1988; Reuveni *et al.*, 1990; Rockel *et al.*, 1994; Zingarelli *et al.*, 1994). O incremento do transporte de Na^+ pelas V-ATPases foi correlacionado com o aumento da quantidade da enzima (Bremberger e Lüttge, 1992; Ratajczak *et al.*, 1994), com a alteração da sua

composição subunitária (Bremberger e Lüttge, 1992; Ratajczak *et al.*, 1994) e com o aumento da sua actividade (Reuveni *et al.*, 1990; Zingarelli *et al.*, 1994). O aumento do transporte de Na^+ sob condições salinas cria as condições necessárias à acumulação mais eficiente de Na^+ nos vacúolos e aumenta a tolerância celular à salinidade ao permitir a manutenção de baixas concentrações de Na^+ no citoplasma. Mas, nem todas as espécies possuem este transportador (Mennen, 1990). Será lógico pensar que este transportador deverá existir nos tonoplastos das células que acumulam Na^+ nos vacúolos. As plantas que durante a filogénese não conservaram este transportador, terão de regular as concentrações citoplasmáticas impedindo o seu influxo. (Jacoby, 1994).

Concentrações exteriores de NaCl elevadas despolarizam a membrana plasmática, possivelmente ao desalojarem o Ca^{2+} , aumentando a sua condutividade eléctrica, aumentando o conteúdo em Na^+ e diminuindo o conteúdo em K^+ (Katsuhara e Tazawa, 1986; Berridge, 1987; Jeschke e Pate, 1991). Schachtman *et al.* (1991) sugeriram que a despolarização abre os canais de efluxo rectificadores, permitindo o influxo de Na^+ e o efluxo de K^+ , sendo este efeito contrariado pelo aumento da concentração de Ca^{2+} (Hoffman *et al.*, 1989; Cramer *et al.*, 1985; Cramer *et al.*, 1987).

A resposta do conteúdo em K^+ ao aumento exterior de Na^+ em diferentes plantas não é uniforme. As halófitas, *Suaeda maritima* (Harvey, 1981; Flowers e Läuchli, 1978; Hajibagheri e Flowers, 1989), *Halimione portulacoides* (L.) Aellen (Figueira, 1992) e algumas glicófitas mais tolerantes ao cloreto de sódio como *Lycopersicon peruvianum*, *Solanum pennellii*, *Sorghum bicolor* (Jacoby, 1994), *Hordeum vulgare* L. e *Beta vulgaris* (Marschner, 1995) quando crescem na presença de NaCl utilizam o Na^+ e o Cl no ajuste osmótico, observando-se uma diminuição da concentração de K^+ . A diminuição de K^+ parece depender da selectividade de compartimentação do K^+ e do Na^+ nas células. Muitas destas espécies conseguem substituir uma grande parte do K^+ por Na^+ e simultaneamente evidenciar aumento no crescimento, o que pode dever-se à permuta vacuolar do K^+ pelo Na^+ (Marschner, 1995; Leidi *et al.*, 1984; Jacoby, 1994) e à selectividade de compartimentação do K^+ e do Na^+ nas células. As espécies e as cultivares com maior tolerância salina deverão ter maior capacidade em manter baixas as concentrações de Na^+ no citoplasma (Hajibagheri *et al.*, 1989).

Muitas plantas, em particular as glicófitas com relativa tolerância ao sal, como *Glycine max* 'Lee' (Läuchli e Wieneke, 1979) e *Zea mays* L. 'DC790' (Marschner, 1995) excluem

o Na^+ e o Cl^- e o ajuste osmótico é feito à custa de solutos orgânicos e de K^+ . A manutenção de um conteúdo adequado de K^+ sob condições salinas parece depender da selectividade na absorção de K^+ . A acumulação de solutos orgânicos no citoplasma, a acumulação de K^+ e a exclusão de Na^+ são processos que a célula executa à custa de energia que deixou de estar disponível para funções anabólicas e por isso estas plantas sofrem decréscimos bastante acentuados do crescimento.

As glicófitas mais sensíveis ou não conseguem manter os níveis de K^+ na presença de concentrações salinas relativamente elevadas (Läuchli e Wieneke, 1979) e a morte advém por desidratação celular ou acumulam Na^+ nos órgãos mais sensíveis à salinidade e ocorre inibição de funções metabólicas e do crescimento, uma vez que o mecanismo de exclusão não consegue evitar o transporte massivo de Na^+ para a parte aérea, quando as suas concentrações exteriores ultrapassam determinados níveis (Marschner; 1995). A soja, classificada por Marschner (1995) como natrofóbica, exhibe, em plantas a crescer em “stress” salino, uma correlação positiva entre a capacidade de evitar o transporte de Na^+ para a parte aérea e a diminuição de crescimento. Num estudo efectuado para comparar os diferentes mecanismos de tolerância salina entre uma espécie tolerante (*Hordeum vulgare*) e uma espécie sensível (*Oryza sativa*), Nakamura *et al.* (1998) verificaram que a tolerância salina de *O. sativa* se encontrava associada à exclusão de Na^+ para o meio exterior e à retranslocação da parte aérea para a raiz. A exposição prolongada a 200 mM NaCl diminuiu a eficiência da exclusão e da retranslocação, causando redução acentuada do peso seco. A maior tolerância de *H. vulgare* foi associada ao facto destas plantas conseguirem evitar, sob 200 mM NaCl, a translocação de Na^+ da raiz para a parte aérea.

A diferença de tolerância inter e intra-específica observada prende-se não só com concentrações iónicas ao nível do organismo inteiro, mas também com a diferença de compartimentação entre a raiz e a parte aérea e em particular com a acumulação nos diversos órgãos aéreos ou mesmo entre tecidos do mesmo órgão. (Yeo, 1994; 1998).

Sob “stress” salino, a maioria das glicófitas acumula Na^+ na raiz, mesmo quando este é excluído da parte aérea. A retenção de Na^+ na raiz de *Phaseolus vulgaris* parece resultar de um processo activo a nível radicular e caulinar através da intervenção de células do parênquima xilémico que retiram o Na^+ da seiva xilémica em ascensão (Jacoby, 1994). Este mecanismo de exclusão activa da seiva xilémica é difícil de explicar através do antiporto com protões, uma vez que a concentração de H^+ é, tal como a de Na^+ , maior na

seiva xilémica do que no citosol das células circundantes (Jacoby, 1994). Este processo poderia ser explicado por transportadores específicos para o Na^+ , que fizessem o seu cotransporte com prótons, só que até à data a sua existência ainda não foi demonstrada em células vegetais (Tester, 1990; Mathuis, 1991).

A tolerância salina de muitas glicófitas é determinada, não tanto pelo conteúdo total da parte aérea mas, pela capacidade de manter gradientes de concentração de Na^+ e Cl^- elevados entre as folhas jovens e as mais velhas, através da restrição da importação para as folhas mais jovens, para as inflorescências e para as sementes (Marschner, 1995; Yeo e Flowers, 1982; Greenway e Munns, 1980). Este mecanismo foi descrito no trigo (Gorham *et al.* 1986) e no milho (Hajibagheri *et al.*, 1987). Em beterraba sacarina, considerada como uma cultura tolerante ao sal, são mantidos elevados gradientes inversos de Na^+/K^+ entre as folhas novas e as mais velhas, tal como em algumas halófitas típicas (Marschner, 1995; Yeo, 1994; Greenway e Munns, 1980). A importância da distribuição foliar do Cl^- na tolerância salina foi demonstrada para o sorgo (Boursier e Läuchli, 1989) e para a cevada (Marschner, 1995; Fricke *et al.*, 1996). Nas duas espécies mencionadas, o Cl^- é particularmente acumulado nas células epidérmicas e na bainha das folhas, enquanto nas células do mesófilo são mantidas com concentrações muito menores de Cl^- . Fricke *et al.* (1996) estudaram não só a distribuição de Cl^- , mas também a de Na^+ e concluíram que, tal como o Cl^- , o Na^+ também se acumulou, preferencialmente, nas células epidérmicas. A uma concentração exterior de 150 mM NaCl as células do mesófilo continham 302 mM de Na^+ e 167 mM de Cl^- e na epiderme as concentrações de ambos atingiram valores próximos de 500 mM. Esta característica é considerada como um factor importante na protecção dos tecidos fotossintéticos dos efeitos do “stress” salino. Estes exemplos mostram como os valores médios da parte aérea e mesmo das folhas podem conduzir a interpretações erradas dos mecanismos de tolerância salina.

A tolerância salina das plantas resume-se à protecção dos mecanismos metabólicos de concentrações iónicas tóxicas, o que é conseguido através da manutenção de condições definidas no citoplasma. Estas condições favorecem o K^+ em relação ao Na^+ , a limitação espacial da actividade total dos iões inorgânicos aos vacúolos e a necessidade de utilização de solutos orgânicos que são metabolicamente neutros e que também poderão ser osmoprotectores. A tolerância salina de um organismo depende do intervalo de salinidade exterior no qual estas condições citoplasmáticas podem ser mantidas.

1.4 Objectivos

Os objectivos deste capítulo centraram-se na influência que a nutrição azotada possa introduzir na tolerância salina de *Pisum sativum*, ao longo do seu desenvolvimento. A percepção dos mecanismos subjacentes às possíveis diferenças de tolerância foram também propósitos deste capítulo. A sua concretização foi efectuada com o cultivo de plantas de *Pisum sativum* 'Resal' durante 75 dias sob presença (90 mM NaCl) ou ausência (0 mM NaCl) de salinidade e sob quatro tipos de nutrição azotada, NO_3^- , NH_4^+ , NH_4NO_3 ou azoto fixado simbioticamente por um isolado de *Rhizobium* halotolerante.

2. Material e Métodos

Nas experiências relatadas neste capítulo cultivaram-se plantas de *Pisum sativum* 'Resal' sob condições que diferiram na concentração de cloreto de sódio, 0 ou 90 mM, e na fonte de azoto disponível, amónio, nitrato, nitrato de amónio ou fixação de N_2 por associação simbiótica com *Rhizobium*.

2.1 Cultura

Sementes de *Pisum sativum* 'Resal' foram embebidas em água corrente, à temperatura ambiente, durante 72 horas. Após este período, foram semeadas em vasos contendo areia, passada por ácido, lavada e esterilizada 90 minutos a 121 °C. Em seguida, os vasos foram regados com soluções de nutrientes, cuja composição comum era: 1mM de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM de KH_2PO_4 , 0,25 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mM de K_2SO_4 , 11,25 μM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 μM de H_3BO_3 , 0,5 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Broughton e Dilworth, 1970 in Somassegaram e Hoben, 1994). A composição das soluções diferia na concentração de

NaCl, 0 e 90 mM, na concentração de azoto 0 ou 5 mM e na forma molecular de azoto inorgânico fornecido, amônio, nitrato ou nitrato de amônio. Num total de oito soluções de rega diferentes: 0 mM NaCl, 0 mM NaCl e 5 mM de NO_3^- , 0 mM NaCl 5 mM NH_4^+ , 0 mM NaCl 5 mM NH_4NO_3 , 90 mM NaCl, 90 mM NaCl e 5 mM de NO_3^- , 90 mM NaCl 5 mM NH_4^+ , 90 mM NaCl 5 mM NH_4NO_3 . O pH das soluções foi ajustado entre 6,6 e 6,8. As plantas regadas com a mesma solução de nutrientes formaram um lote. Cada lote é composto por quinze vasos, três por colheita. Os vasos foram, então, transferidos para um compartimento envidraçado, o que proporcionou iluminação natural. Procedeu-se, bissemanalmente, a regas intercaladas, de solução de nutrientes ou água desionizada. Após a emergência, cada plântula, dos lotes com 0 mM de azoto inorgânico, foi inoculada com 1 mL de cultura em YMB, contendo 10^6 a 10^8 células de *Rhizobium* (isolado NI-1,2,3).

2.2 Colheita e Conservação do Material Vegetal

Com uma periodicidade quinzenal, foram feitas colheitas até as plantas possuírem sementes completamente formadas mas ainda verdes. Ou seja, cinco colheitas, 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência das plântulas.

Após separação da parte aérea, as raízes foram lavadas, primeiro em água corrente e depois em água destilada, por forma a remover a areia. Antes da determinação do peso fresco em balança analítica, o excesso de água foi removido com papel absorvente. O peso fresco das partes aéreas também foi determinado. A presença/ausência de flores ou vagens foi anotada, bem como a densidade e a coloração dos nódulos radiculares. Na quinta colheita, as vagens foram destacadas da parte aérea vegetativa e as sementes da mesma planta pesadas em conjunto. As colheitas foram realizadas sem interrupções, a fim de evitar a alteração do peso fresco por desidratação dos tecidos vegetais.

As raízes, as partes aéreas e as sementes foram, separadamente, congeladas em azoto líquido, reduzidas a pó num moinho de café e armazenadas a -30 °C para posterior utilização.

2.3 Quantificação dos iões solúveis

O método de extracção de iões solúveis usado foi o descrito por Arimura e Hiroshima (1996), tendo sido introduzidas algumas alterações. A extracção dos iões solúveis foi feita por maceração mecânica, em microtubos de 1,5 mL, de 0,25 g de material vegetal, congelado em azoto líquido e mantido a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, com 1 mL de água destilada e desionizada no dia da extracção. Seguidamente, procedeu-se a centrifugação durante 15 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente recuperado e filtrado por membranas de PTFE com 0,2 μm de poro. A solução filtrada foi recolhida em microtubos de 1,5 mL devidamente identificados. Os microtubos foram mantidos a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ até se proceder à quantificação dos iões.

Os iões foram determinados por electroforese capilar (Waters Quanta 4000E). Este equipamento permite a detecção simultânea de vários iões e a sua quantificação a concentrações bastante baixas (dependendo do método, poderá detectar alguns μg por litro).

Os catiões quantificados foram, o NH_4^+ , o K^+ , o Ca^{2+} , o Na^+ e o Mg^{2+} . Os catiões em solução aquosa foram injectados hidrostáticamente durante 30 segundos e separados por um capilar de sílica com 75 μm de diâmetro interno e com 60 cm de comprimento (50 cm até ao detector), durante sete a dez minutos a +20 KV (fonte de energia positiva). As separações foram intercaladas com purgas de 1,5 minutos. O electrólito utilizado foi o “Low Mobility Cation Electrolyte” (Waters). Os iões foram detectados, indirectamente, por uma lâmpada de Zinco à qual foi aplicado um filtro de 214 nm.

Os aniões quantificados foram, o Cl^- , o SO_4^{2-} , o NO_3^- , o oxalato, o citrato e o HPO_4^{2-} . Os aniões em solução aquosa foram injectados hidrostáticamente durante 30 segundos e separados por um capilar de sílica com 75 μm de diâmetro interno e com 60 cm de comprimento (50 cm até ao detector), durante cinco minutos a -15 KV (fonte de energia negativa). As separações foram intercaladas com purgas de 2 minutos. O electrólito utilizado foi o “High Mobility Anion Electrolyte” (Waters). Os iões foram detectados, indirectamente, por uma lâmpada de Mercúrio à qual foi aplicado um filtro de 254 nm.

A identificação dos iões foi conseguida por comparação entre os electroferogramas dos padrões e das amostras. Na gama das concentrações lidas, entre 0,08 e 2,5 mg L^{-1} para uns iões e entre 5 e 100 mg L^{-1} para outros. A área dos picos varia linearmente com a sua

concentração, possibilitando a quantificação dos íons presentes nas amostras a partir das equações das rectas padrão calculadas.

2.4 Análise estatística

A comparação das médias foi feita através da análise de variância de factor único. A interacção entre a salinidade e o tipo de nutrição azotada, as duas variáveis do crescimento estudadas neste capítulo, foi determinada através da análise de variância de factor duplo com repetição. Nas duas análises estatísticas a probabilidade de erro admitida foi $<0,05$ e o tamanho da amostra foi, para o crescimento vegetativo, dezasseis e para as sementes, doze.

3. Resultados


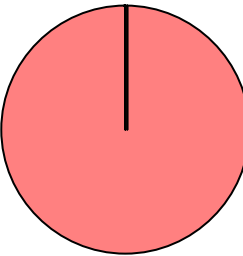
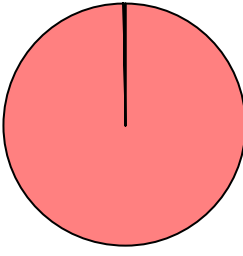
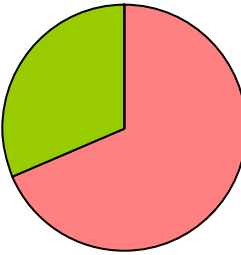
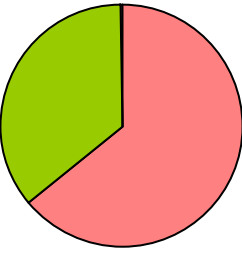
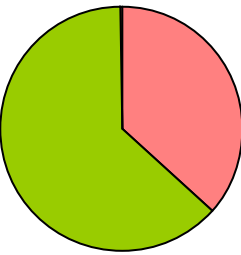
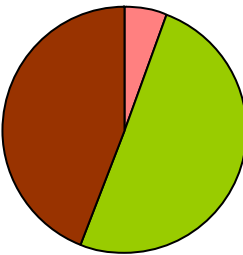
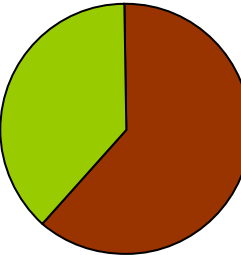
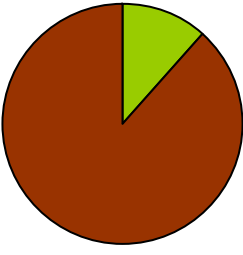
Neste capítulo é avaliada a influência da nutrição azotada na tolerância à salinidade de *Pisum sativum* 'Resal' ao longo do seu desenvolvimento ontogénico. A avaliação é feita através do crescimento vegetativo, pesos frescos da raiz e da parte aérea, da produtividade, peso fresco das sementes e do estado nutricional das plantas, inferido pelas concentrações iónicas destes órgãos.

3.1 Crescimento

3.1.1 Crescimento vegetativo

A análise das figuras IV-1 e IV-2 evidencia a salinidade e a nutrição azotada como factores condicionantes do crescimento das plantas. A sua influência aumenta ao longo do tempo, nas fases mais avançadas do seu desenvolvimento: 45, 60 e 75 dias nas raízes; 60 e 75 dias

Tabela IV-1: Densidade e registo cromático dos nódulos radiculares presentes em plantas de *Pisum sativum* inoculadas com *Rhizobium*, isolado N-(1,2,3), a crescerem sob condições 0 ou 90 mM. O diâmetro dos gráficos é directamente proporcional à densidade média de nódulos presentes na raiz (menos de 30 ou mais de 30). A ausência ou presença de nódulos, bem como a densidade relativa e a coloração que apresentam (branca, rosa, verde ou castanha), encontram-se também registadas.

período de crescimento	salinidade NaCl	
	0 mM	90 mM
15 dias		plantas não noduladas
30 dias		
45 dias		
60 dias		
75 dias		

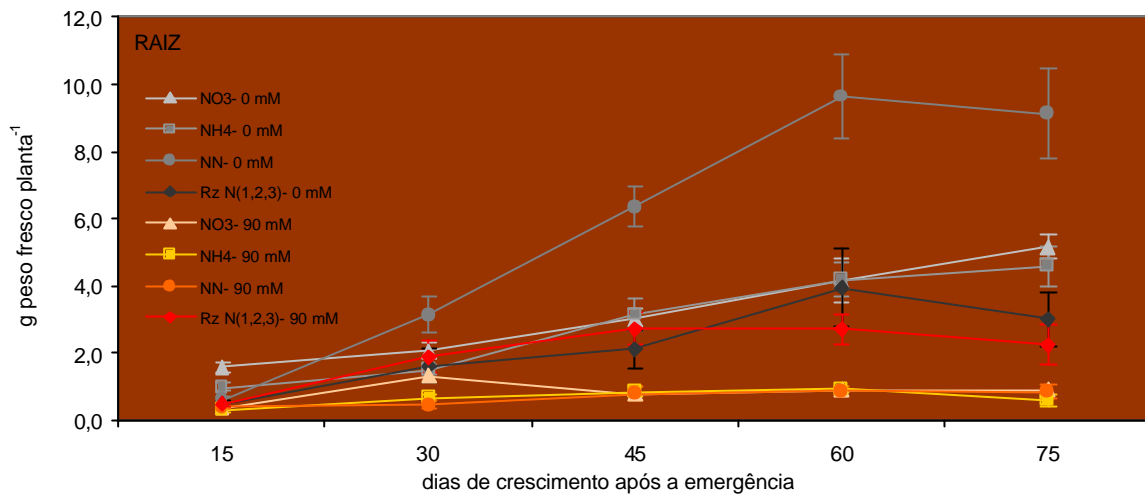


Figura IV-1: Crescimento vegetativo radicular de plantas de *Pisum sativum* cv. Resal a crescerem, ao longo de 75 dias, sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Os valores são médias (\pm DP) de 16 plantas.

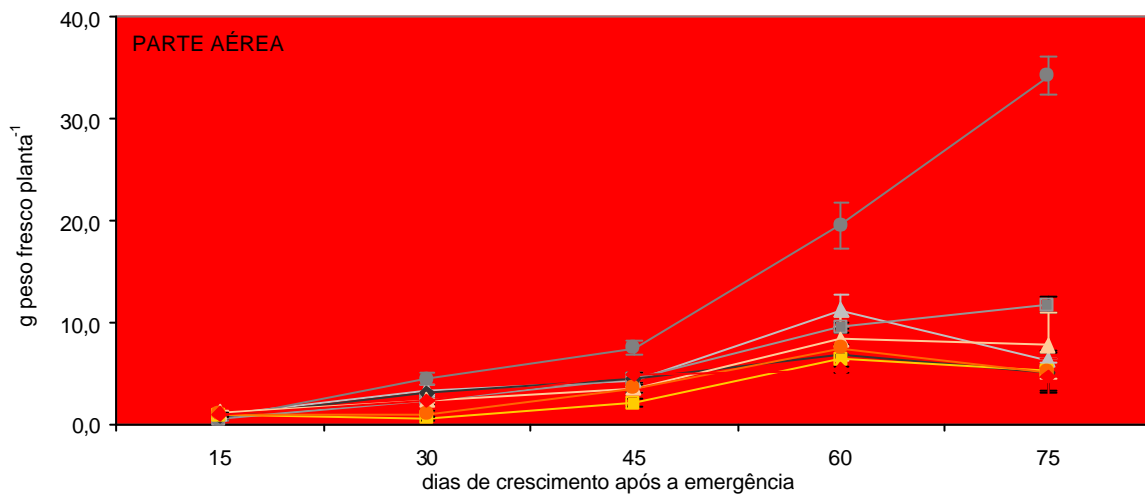


Figura IV-2: Crescimento vegetativo da parte aérea de plantas de *Pisum sativum* cv. Resal a crescerem, ao longo de 75 dias, sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Legenda igual à da figura IV-1. Os valores são médias (\pm DP) de 16 plantas.

nas partes aéreas. Comparando as plantas que cresceram sob a presença e a ausência de NaCl, as primeiras foram, na generalidade, significativamente menores, sendo o crescimento da parte aérea mais afectado. O crescimento da parte aérea das plantas que se desenvolveram com amónio ou nitrato de amónio, foi mais penalizado pela salinidade do que o das inoculadas com *Rhizobium* ou nutridas com NO_3^- .

As raízes das plantas inoculadas com *Rhizobium* foram as menos afectadas pela salinidade. No início do seu desenvolvimento, 15 e 30 dias, essa diferença nem sequer foi significativa. O efeito da salinidade na nodulação foi reduzido. Não foi possível distinguir diferenças nas dimensões dos nódulos e as variações de densidade foram sempre inferiores a 20% (tabela IV-1).

A nutrição azotada, o outro factor que, neste capítulo, se fez variar também influenciou, de modo significativo, o crescimento vegetativo das plantas. O lote de plantas que cresceram sob condições não salinas e com nitrato de amónio, foi o principal responsável por tão significativa variação.

3.1.2 Produtividade

Sob condições não salinas, a produtividade foi duas a quatro vezes maior quando a fonte de azoto ministrada às plantas foi o nitrato de amónio (figura IV-3). O maior peso das sementes nas plantas cultivadas nestas condições deveu-se principalmente ao maior

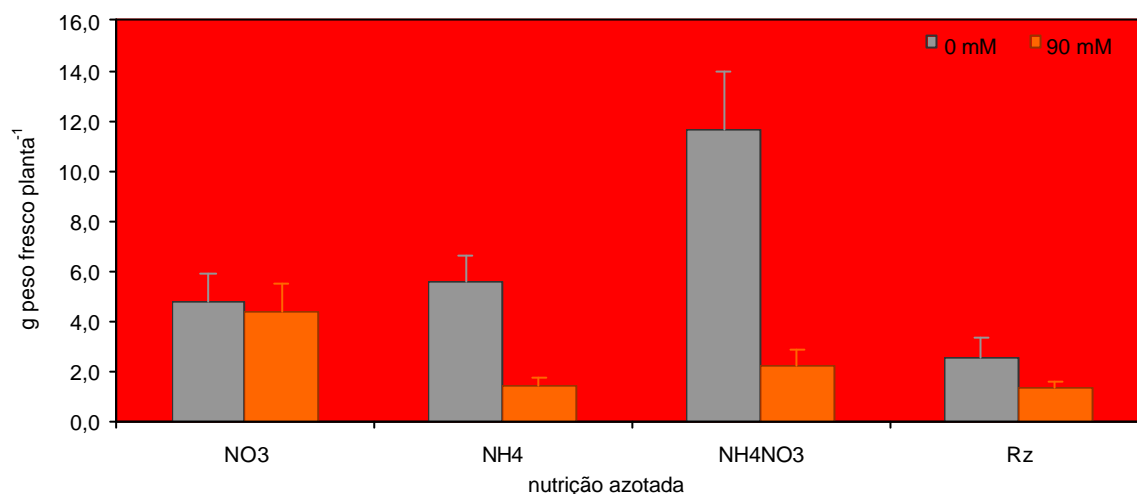


Figura IV-3: Produtividade de plantas de *Pisum sativum* Resal' após de 75 dias de crescimento, sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Os valores são médias (\pm DP) de 12 plantas.

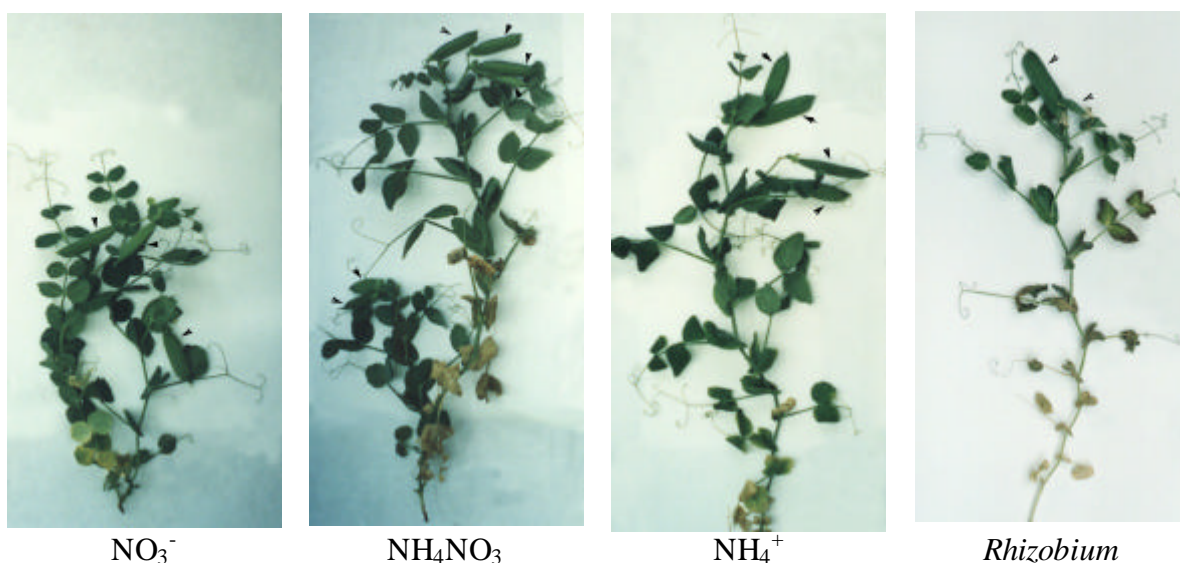


Figura IV-4: Fotografia de plantas de *Pisum sativum* 'Resal' após de 75 dias de crescimento, sob diferentes condições de nutrição azotada e na ausência de salinidade. As setas indicam a localização das vagens.

número de sementes por planta. Este foi conseguido à custa do aumento do número vagens. Com efeito, na ausência de salinidade as plantas dependentes de nitrato de amónio tiveram em média 4,75 vagens, enquanto o número médio de vagens das plantas que cresceram nas restantes condições azotadas variou entre 2,75 e 1,75 (figura IV-4). Sob condições salinas as plantas nutridas com amónio ou com nitrato de amónio mostraram maior vulnerabilidade e a produtividade diminuiu cinco vezes. Nas plantas que fixaram N_2 ou que absorveram NO_3^- a diminuição do peso fresco das sementes, causada pela salinidade, foi muito menor, não sendo significativa nas plantas dependentes do nitrato como fonte de azoto (figura IV-3).

As duas variáveis de crescimento estudadas, salinidade e nutrição azotada, interagiram entre si. Confirmando assim que a forma de azoto disponibilizada influencia a tolerância que as plantas em estudo, *Pisum sativum* 'Resal', evidenciaram à salinidade. Esta influência foi mais notória na parte aérea das plantas.

3.2 Concentração iónica

3.2.1 Raiz

A salinidade, a nutrição azotada e o estágio de desenvolvimento das plantas são todos factores que condicionam os níveis de iões na raiz. A concentração de uns iões é mais influenciada pela salinidade, como é o caso do Na^+ , do Cl^- e do Ca^{2+} . A de outros é mais influenciada pela nutrição azotada, as concentrações de NH_4^+ , K^+ , NO_3^- e Na^+ são menores nas plantas que fixaram N_2 . Os níveis de uns catiões são mais ou menos constantes ao longo de todo o período de crescimento analisado, o NH_4^+ , o Ca^{2+} , o oxalato e o citrato são disso exemplos. Noutros, as concentrações são explicadas pela acção conjunta de dois ou dos três factores. Como é o caso do aumento da concentração de K^+ em plantas com 30 dias de crescimento e sob disponibilidade de NO_3^- , do aumento de concentração de Na^+ em plantas com 30 e 60 dias sob "stress" salino, do aumento linear de NO_3^- ao longo do tempo em plantas submetidas a nutrição de NH_4NO_3 , do aumento e mais tarde da diminuição de NO_3^- nas plantas dependentes de nitrato como fonte de azoto, do aumento de Pi aos 30 e 60

dias de crescimento intercalado pela diminuição aos 45 dias e do aumento de SO_4^{2-} aos 60 dias das plantas a crescer na presença de NaCl (figuras IV-5, IV-6 e IV-7).

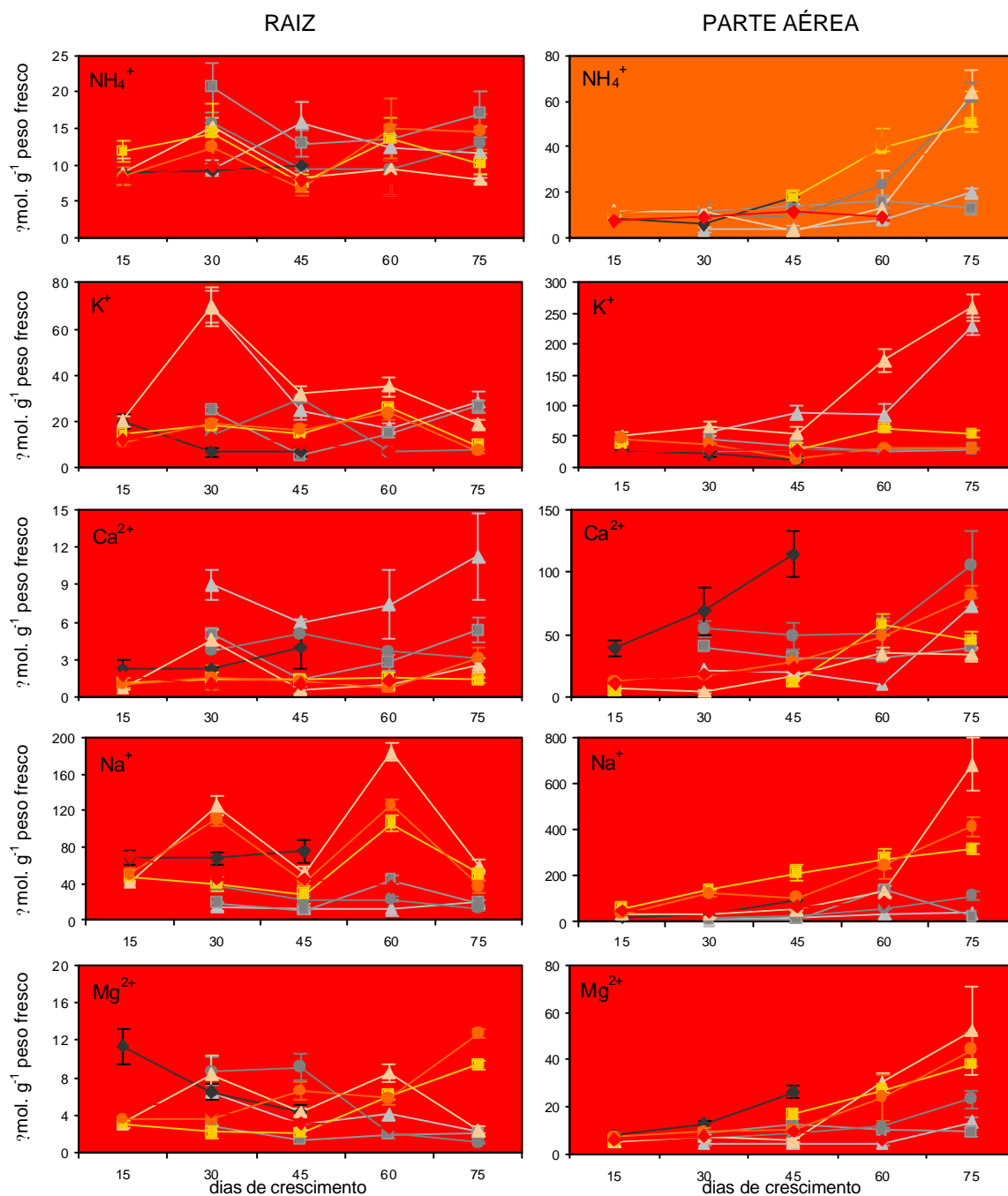


Figura IV-5: Concentração de cátions solúveis na raiz e na parte aérea de plantas de *Pisum sativum* cv. Resal cultivadas sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada: ∇ NO_3^- ; \square NH_4^+ ; \circ NH_4NO_3 ; \diamond $\text{Rhizobium N}(1,2,3)$; tons cinza-0 mM; tons laranja-90 mM. Os valores são médias (\pm DP) de 6 réplicas.

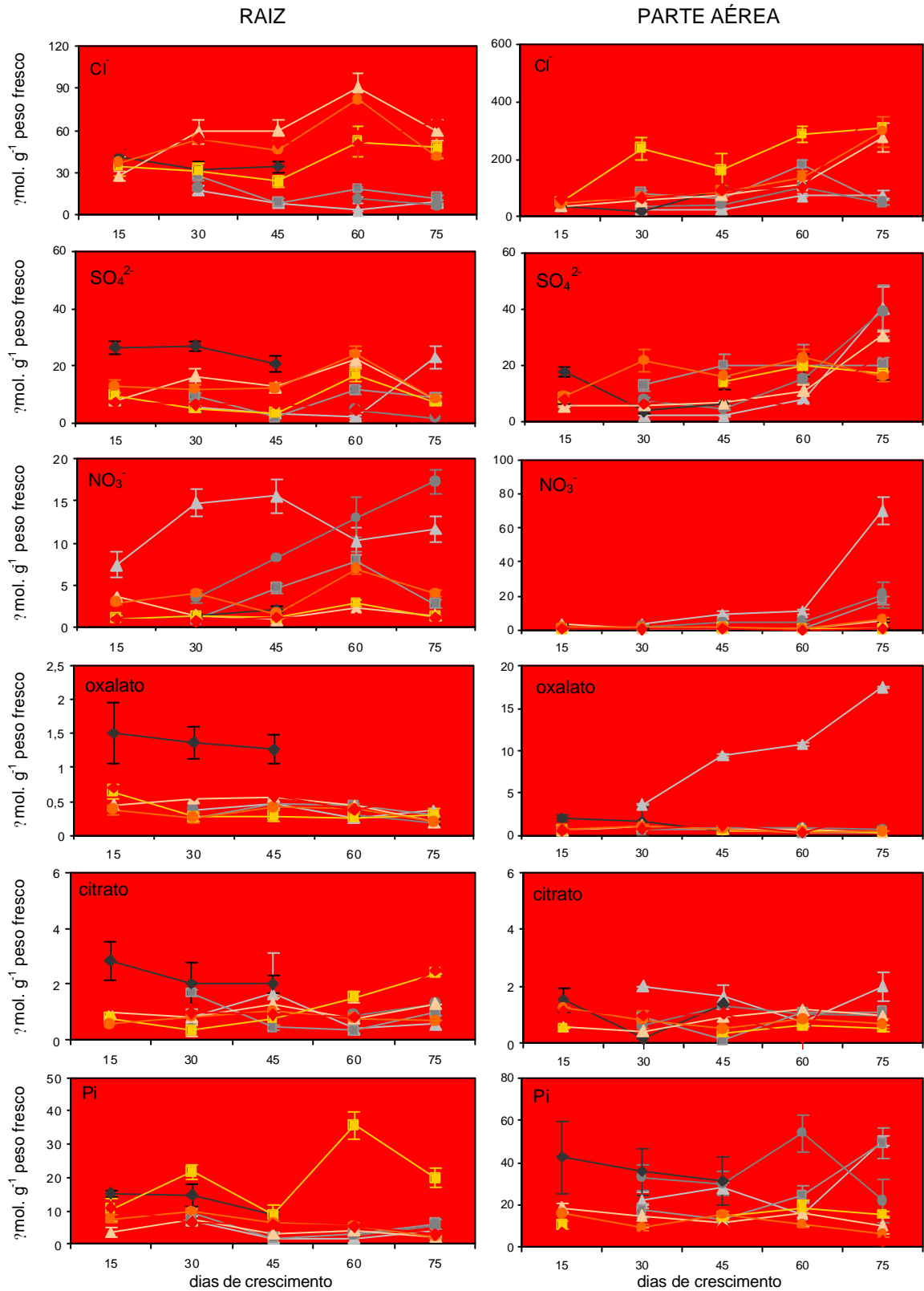


Figura IV-6: Concentração de ânions solúveis na raiz e na parte aérea de plantas de *Pisum sativum* cv. Resal cultivadas sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada: ∇ NO_3^- ; \circ -NH_4^+ ; \square $\text{-NH}_4\text{NO}_3$; \circ $\text{-Rhizobium N(1,2,3)}$; tons cinza-0 mM; tons laranja-90 mM. Os valores são médias (\pm DP) de 6 réplicas.

3.2.2 Parte aérea

Na parte aérea os íons mostram tendência a aumentar com o tempo. Este crescimento é visível nos cátions aos 60 dias de crescimento, sendo mais marcado nos cátions monovalentes do que nos divalentes, na maioria dos aniões apenas é visível aos 75 dias. Esta tendência é contrariada pelas plantas que obtêm o azoto por fixação simbiótica com *Rhizobium*, em especial na presença de salinidade e pelas concentrações de Pi na parte aérea.

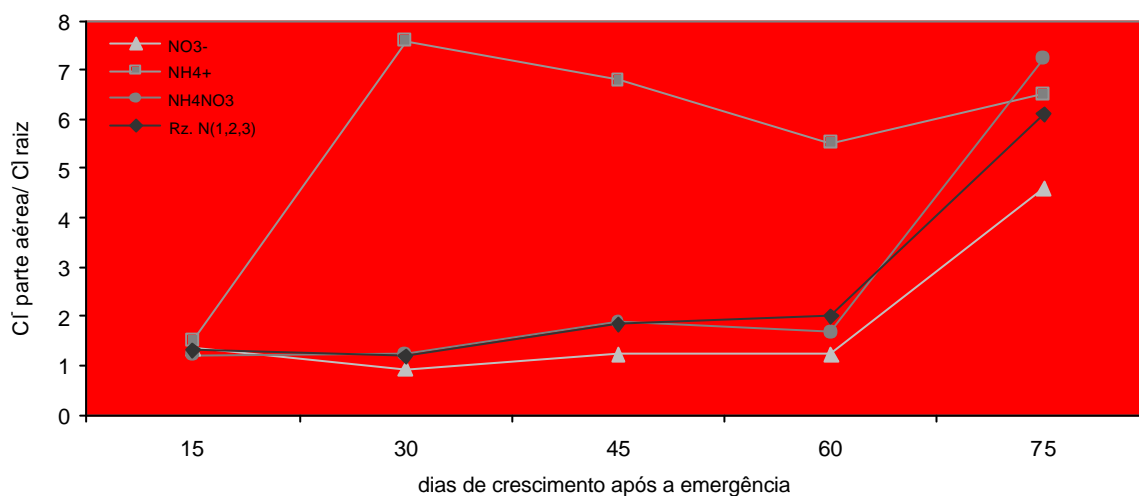


Figura IV-7: Razões de Cl⁻ entre a parte aérea e a raiz de plantas de *Pisum sativum* 'Resal' cultivadas sob 90 mM NaCl e diferentes condições de nutrição azotada.

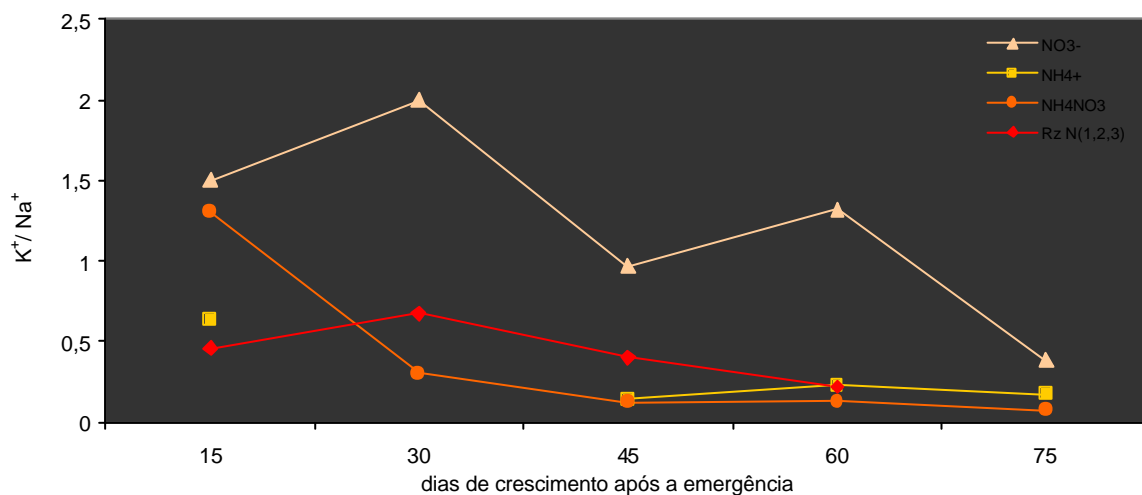


Figura IV-8: Razões de K⁺/Na⁺ na parte aérea de plantas de *Pisum sativum* 'Resal' cultivadas sob 90 mM NaCl e diferentes condições de nutrição azotada.

O aumento de concentração iônica que acompanha o desenvolvimento das plantas parece, em alguns casos, ser algo independente da salinidade e da nutrição azotada, NH₄⁺, SO₄²⁻ e Ca²⁺. Neste último, são exceção as plantas que cresceram na presença de NaCl e que

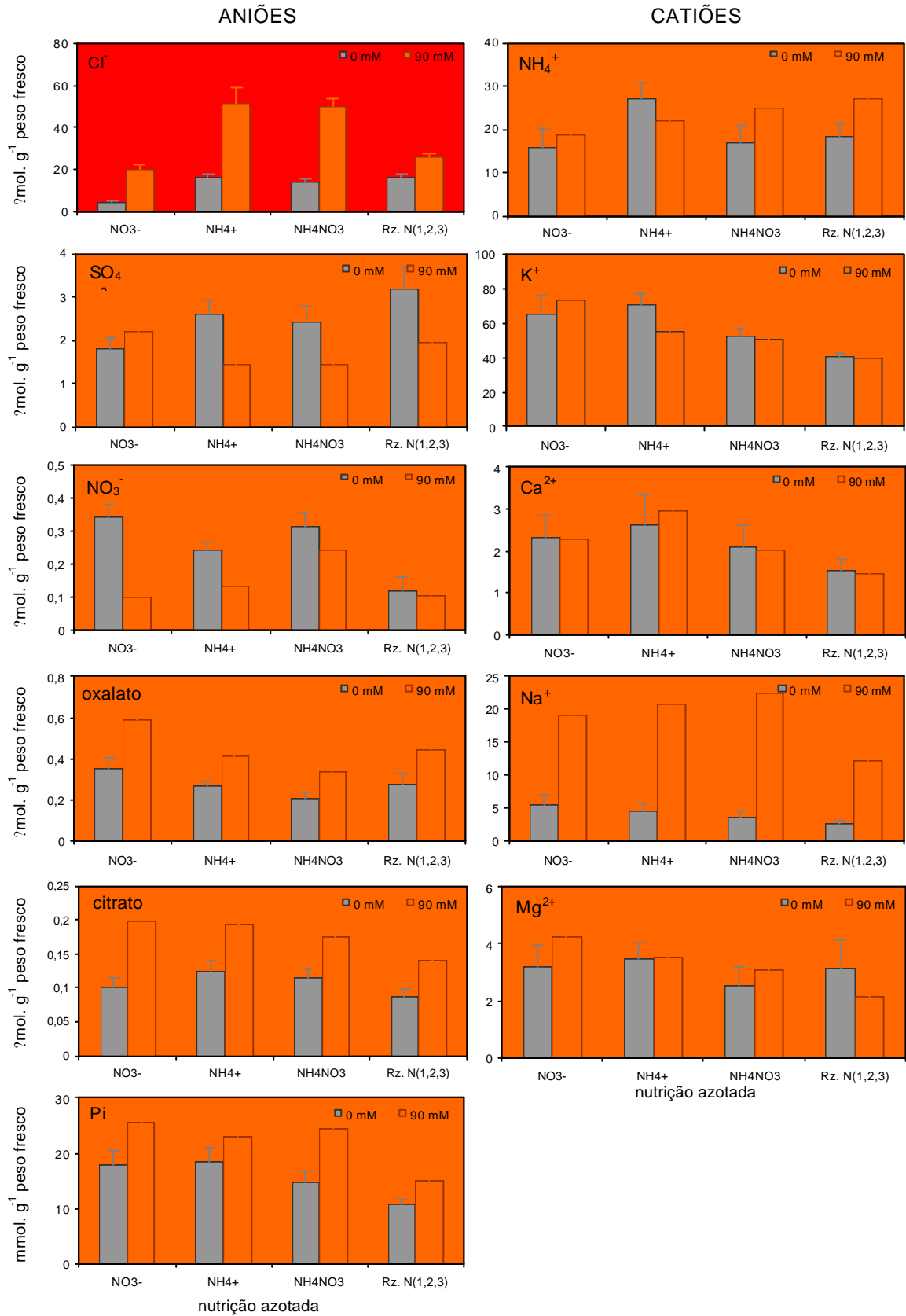


Figura IV-9: Concentração de cátions e ânions solúveis em sementes de plantas de *Pisum sativum* cv. Resal cultivadas 75 dias sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Os valores são médias (+ DP) de 9 réplicas.

fixaram N_2 . Outros há em que o aumento de concentração a partir dos 45 dias varia com a forma de nutrição azotada ou com o sal.

É o caso do aumento da concentração de K^+ e do maior valor da razão K^+/Na^+ nas plantas dependentes de NO_3^- e dos maiores incrementos de Mg^{2+} nas plantas sujeitas a “stress” salino. Noutros iões as concentrações observadas são a combinação dos efeitos da salinidade, da nutrição azotada e da idade da planta. Sob condições de salinidade as plantas com 60 dias têm maiores concentrações de Na^+ se absorverem amónio (NH_4^+ ou NH_4NO_3), aos 75 dias a situação altera-se e a concentração de Na^+ mais elevada é registada nas plantas dependentes do NO_3^- (figuras IV-5, IV-6 e IV-8).

3.2.3 Semente

Com excepção do Na^+ e do Cl^- , a composição iónica da semente parece não variar muito com a salinidade. Ocorrendo aumentos pouco acentuados, como é o caso do oxalato, do citrato e do Pi , diminuições pouco acentuadas, como é o caso do NO_3^- , do SO_4^{2-} , ou pequenas variações que nuns tratamentos azotados se traduzem em aumento e noutros em diminuição, como no Ca^{2+} , no Mg^{2+} , no K^+ e no NH_4^+ (figura IV-9).

4. Discussão

4.1 Crescimento vegetativo

4.1.1. Nutrição com nitrato de amónio

As diferentes condições de crescimento proporcionadas às plantas afectaram significativamente o crescimento vegetal. O fornecimento de nitrato de amónio sem adição de $NaCl$ foi a condição que originou maior crescimento e maior produtividade (figuras IV-1, IV-2 e IV-3). O incremento no crescimento estará, certamente, relacionado com o efeito que uma nutrição azotada mista, de catiões e aniões, tem na manutenção do pH das células

radiculares através de taxas de produção (assimilação de NH_4^+) e de consumo (assimilação de NO_3^-) de protões, proporcionando menores custos energéticos na manutenção da homeostase de pH citosólico, usualmente entre 7,3 e 7,6 (Marschner, 1995). Este tipo de nutrição também não favorece a absorção de catiões em detrimento dos aniões, contribuindo para o maior equilíbrio nutricional. Em conjunto, estes factores proporcionaram as condições para um desenvolvimento óptimo que se tornou evidente no crescimento e na produtividade evidenciados pelas plantas que cresceram sob estas condições. Os benefícios de uma nutrição azotada mista no crescimento vegetal foram já descritos por diversos autores. Resultados semelhantes foram descritos para o tomate (Ganmore-Newman e Kafkafi, 1980) e para a soja (Rufty *et al.*, 1983). Na maioria dos casos, o aumento que se verificou na produtividade deve-se ao maior número de sementes por planta (Below, 1995; Doré *et al.*, 1998).

São vários os autores que apontam *Pisum sativum* como uma cultura cuja produtividade é bastante variável (Pate, 1977; Davies *et al.*, 1985; Doré *et al.*, 1998). A elevada variabilidade da produtividade de *Pisum sativum* observada por Doré *et al.* (1998), sob diferentes condições de crescimento, deveu-se não ao maior tamanho individual das sementes, mas ao seu número. O maior número de sementes foi conseguido à custa do aumento do número de vagens produzido por planta. Os resultados deste capítulo comprovam esse efeito. De facto, na ausência de salinidade, as plantas dependentes de nitrato de amónio tiveram em média 4,75 vagens, enquanto as plantas a crescer nas restantes condições azotadas o número médio de vagens variou entre 2,75 e 1,75 (figura IV-4).

A salinidade parece desequilibrar este sistema. Na presença de cloreto de sódio a vantagem que a nutrição azotada mista proporcionou ao desenvolvimento vegetal desapareceu e estas plantas tornaram-se tanto ou mais vulneráveis do que as plantas nutridas com outras formas de azoto.

4.1.2. Nutrição com amónio

Em qualquer dos tratamentos azotados a parte aérea não teve diferenças nítidas de concentração de amónio, o que reflecte a independência destes valores da absorção de NH_4^+ e da sua translocação para a parte aérea, uma vez que o amónio é primeiro assimilado

nas raízes antes de ser mobilizado para outras partes da planta (Marschner, 1995; Pate, 1977). Os valores são mais o reflexo da desaminação necessária à incorporação em novas moléculas azotadas. Este processo é particularmente activo em *Pisum sativum*. Pate (1977) referiu que parte do azoto presente na semente foi recirculado cerca de seis vezes, passando sucessivamente para órgãos cada vez mais jovens. O aumento de NH_4^+ quando o estágio de desenvolvimento da planta é mais avançado poderá reflectir a forte mobilização do azoto da parte vegetativa para a semente, numa altura em que o seu desenvolvimento e o crescimento se está a processar. Estes resultados são concordantes com os descritos por Lam *et al.* (1996), que referem a libertação de amónio durante vários processos bioquímicos como o catabolismo de proteínas, desaminação de aminoácidos e algumas reacções biossintéticas específicas. A reciclagem de amónio ocorre ao longo de todo o desenvolvimento da planta. Contudo, existem dois períodos onde quantidades elevadas de amónio são libertadas e reassimiladas em glutamina e glutamato para serem transportadas. O primeiro acontece durante a germinação, quando as proteínas de reserva são hidrolizadas e o azoto transportado para a plântula em crescimento. A segunda ocorre quando as proteínas, das folhas em senescência, são degradadas e o azoto é reassimilado e transportado para a semente em desenvolvimento.

A nutrição com amónio mostrou vulnerabilizar as plantas à presença de sal. Estas foram as que cresceram pior e as que tiveram menor produtividade. A conclusões idênticas chegaram Leidi *et al.* (1992) em *Gossypium hirsutum* e *Arachis hypogaea* L., Lewis *et al.* (1989) em *Zea mays* e Feigin (1990) em *Cucumis melo* L..

A diminuição da tolerância salina constatada poderá estar relacionada com a menor absorção de catiões, em particular de K^+ e com as maiores acumulações de Na^+ e em especial Cl^- na parte aérea (figuras IV-5, IV-6 e IV-7). Outros autores fazem referência a influências idênticas provocadas pela nutrição com NH_4^+ a plantas cultivadas sob “stress” salino. Martínez e Cerdá (1989) notaram que a adição de NH_4^+ ao meio de crescimento diminuiu a acumulação de K^+ em plantas de *Cucumis sativus* a crescer em condições salinas. Estes autores constataram ainda que o aumento da razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ levou a que as plantas acumulassem nas folhas mais Cl^- e Na^+ e menos K^+ e Ca^{2+} . Leidi *et al.* (1992) verificaram que o peso seco das duas espécies sob estudo (algodoeiro e amendoim) foi mais afectado pela salinidade quando o amónio foi a forma de azoto presente na solução de nutrientes. Estes autores explicaram a diminuição do crescimento pelo facto do amónio ser

uma fonte de azoto metabolicamente mais dispendiosa à raiz, uma vez que este é exclusivamente aqui assimilado, o que poderia resultar numa menor disponibilidade de carbono para o crescimento da raiz e na indução de deficiências nutritivas, em especial de K^+ e de Ca^{2+} . A acumulação de Cl na parte aérea das plantas foi, entre 30 e 60 dias de crescimento, duas a quatro vezes maior do que nos restantes tratamentos. Se estes níveis forem tóxicos para a planta, este poderá ser um dos factores que contribui para a menor tolerância destas plantas à salinidade. Num estudo que compara o conteúdo iónico de três espécies com diferentes tolerâncias salinas, *Phaseolus vulgaris* foi a mais sensível, evidenciando uma redução significativa do crescimento a 25 mM NaCl. A toxicidade provocada pelo cloro foi a principal razão apontada para a diminuição do crescimento, uma vez que os níveis de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} não sofreram grande alteração mesmo a 100 mM (Marschner, 1995). A variação de tolerância salina entre diferentes cultivares, de soja foram relacionadas com a restrição do transporte de Cl das raízes para a parte aérea (Parker *et al.*, 1987).

As variações na acumulação de nutrientes provocadas pelo NH_4^+ estarão, certamente, relacionadas com a diminuição de pH celular e do apoplasto que a absorção e a assimilação de NH_4^+ provoca. Marschner (1995) relacionou esta variação de pH com a diminuição da absorção de cationes e o aumento de absorção de aniões.

A toxicidade do NH_4^+ poderá fragilizar ainda mais as plantas já vulnerabilizadas pela presença de NaCl. O NH_4^+ é tóxico mesmo a concentrações celulares relativamente baixas. Bennete e Adams (1970) quantificaram a concentração exterior de NH_4^+ conducente a toxicidade incipiente em plantas de algodoeiro e concluíram que esta estaria entre 0,15 e 0,2 mM. Rabe (1990; 1994) concluiu que a acumulação de NH_4^+ no citoplasma acelera a sua assimilação, a acumulação de compostos azotados ligados ao “stress” e a diminuição da actividade metabólica e do crescimento. Segundo Haynes (1986), o amónio começa a inibir o crescimento vegetativo quando a sua absorção excede a sua assimilação. A acumulação de NH_4^+ dissipa os gradientes de protões através das membranas, necessários ao transporte iónico (Smart e Bloom, 1998). Leidi *et al.* (1989) explicaram a maior sensibilidade de plantas de milho, sob “stress” salino, à nutrição azotada sob a forma de NH_4^+ devido ao efeito inibitório da salinidade na desintoxicação do amónio, acumulado pela redução da assimilação de NH_4^+ , medida pela síntese de arginina. A absorção de azoto na forma de amónio soma à toxicidade do NaCl a toxicidade do NH_4^+ . Deste modo, o nível

de “stress” nas plantas aumenta. Para cooperarem com esta situação elas têm maiores dispêndios de fotossintetizados e ficam com menor quantidade de energia disponível para o crescimento vegetativo e reprodutivo comparativamente aos restantes tratamentos azotados.

4.1.3. Nutrição com nitrato

Nas plantas nutridas com NO_3^- a restrição do Na^+ a nível radicular é mais pronunciada, o que é evidenciado pelo maior valor da razão K^+/Na^+ que estas plantas apresentam na parte aérea (figura IV-8) e poderá contribuir para o aumento da tolerância salina evidenciada por estas plantas. Um estudo conduzido por Subbarao *et al.* (1990) evidenciou que a maior tolerância salina de *Atylosa albicans*, *A. platycarpa* e *A. sericea* está associada à maior eficiência na regulação do transporte acrópeto de Na^+ e Cl^- e à manutenção da selectividade de K^+ . O mecanismo de exclusão aérea observado parece ter perdido muita da sua eficiência na fase mais avançada do desenvolvimento das plantas. No espaço de 15 dias (entre os 60 e os 75 dias) a concentração de Na^+ na parte aérea aumentou cerca de cinco vezes e na raiz diminuiu três. A razão do conteúdo em cloro entre a parte aérea e a raiz é mantida próxima da unidade. No entanto, no final do crescimento sobe seis vezes (figura IV-7). Assim, durante a maior parte do período de desenvolvimento as plantas dependentes de NO_3^- acumulam na parte aérea menos 20 a 50 % de Cl^- , menos 30 a 70 % de Na^+ e mais 0,4 a 3,6 vezes de K^+ .

A menor inibição que o cloreto de sódio causou no crescimento da parte aérea e na produtividade estará, certamente, relacionada com a maior acumulação de catiões, em especial K^+ , nas plantas que absorvem NO_3^- (Marschner, 1995; Grattan e Grieve, 1994). A utilização de catiões no equilíbrio do pH citosólico para compensar o maior consumo de prótons resultante da assimilação de NO_3^- foi descrito por Marschner (1995) e observado por vários autores (Martínez e Cerdá, 1989; Feigin, 1990). O nitrato também reduziu a quantidade total de Cl^- . O que poderá ocorrer devido à menor absorção causada pela competição entre os dois aniões (Caldwell *et al.*, 1986; Gilkey, 1989; Marschner, 1995; Pope *et al.*, 1987; Tyerman, e Findlay, 1989; Tyerman, 1992). A inibição da absorção de Cl^- pelo NO_3^- foi descrita por vários autores como uma das causas da maior tolerância das

plantas à salinidade (Bernstein *et al.*, 1974; Kafkafi *et al.*, 1982; Feigin *et al.*, 1987; Abdul-Kair e Paulsen, 1982). Rogers *et al.* (1987) verificaram que a diferença de tolerância à salinidade que duas populações de *Trifolium repens* evidenciaram se devia à menor absorção de Cl e à maior eficiência da sua restrição da parte aérea. Läuchli e Wieneke (1979) notaram que algumas variedades de *Glycine max* exibiam diferentes tolerâncias salinas e esta diferença podia ser associada à restrição do transporte xilémico de Cl. Rogers *et al.* (1997) e Läuchli e Wieneke (1979) concluíram que dentro destas espécies a tolerância salina parece estar associada à exclusão de Cl, em particular da parte aérea.

As plantas nutridas com NO_3^- experimentaram menor toxicidade na parte aérea do que as dos restantes lotes, devido à menor acumulação de Na^+ e Cl, compensada pelo aumento de K^+ . Razão que, certamente, terá contribuído para a pequena diminuição da produtividade observada nas plantas com este tipo de nutrição e que sugere o NO_3^- como a melhor fonte de azoto para o crescimento de *Pisum sativum* sob condições de salinidade moderada. À mesma conclusão chegaram Leidi *et al.* (1992) e Silberbush e Lips (1991^a; 1991^b).

4.1.4. Nutrição dependente da fixação simbiótica de azoto diatômico

As plantas com menor produtividade são as dependentes da fixação simbiótica de azoto diatômico, o que se verifica tanto na presença como na ausência de NaCl (figura IV-3). A baixa produtividade poderá estar relacionada com o maior esforço metabólico pela qual estas plantas passam, em relação às dependentes da absorção de azoto inorgânico. Uma grande parte da energia fornecida à raiz é utilizada em processos anabólicos conducentes à formação dos nódulos e da “maquinaria” metabólica necessária à fixação de N_2 . Mais tarde, os dispêndios energéticos continuam a ser maiores devido não só ao processo de fixação em si, mas também à manutenção das condições que permitem esse processo, como baixas concentrações de O_2 , rápida mobilização do azoto fixado e assimilado nos nódulos e aumento da biomassa nodular. Phillips (1980), Streeter (1985) e Vance e Heichel (1991) estimaram os custos da fixação de 1 grama de azoto em 2 a 20 g de carbono. Estes são repartidos pelo estabelecimento, crescimento e respiração dos nódulos (36 a 39%), pela actividade da nitrogenase (42 a 45%) e pela assimilação de NH_3 e exportação dos aminoácidos resultantes (16 a 22%). Em *Pisum sativum*, Mahon (1977) estimou o coeficiente de respiração associado com a actividade das nitrogenases, após subtrair o

crescimento e a respiração associada à manutenção, como sendo 6,8 gramas de carbono por grama de azoto. Harvey (1977) descreveu os gastos de hidratos de carbono da raiz e dos nódulos em plantas de *Pisum sativum* 'Meteor' no início do seu desenvolvimento vegetativo. Os dados mostram que dois terços dos fotossintetizados foram transportados basipetamente, 42% para a raiz e 32 % para os nódulos. O crescimento da raiz utilizou 7% e os restantes 35% foram consumidos pela respiração. Nos nódulos, 12% dos fotossintetizados foram gastos na respiração, 5% no crescimento e 15% foi combinado com azoto e retranslocado para a parte aérea. A maior quantidade de iões, Mg^{2+} , Pi , SO_4^{2-} e ácidos orgânicos, citrato e oxalato, que as plantas, e em especial as raízes, dependentes do N_2 apresentam poderão também indiciar o gasto energético adicional usado na fixação de N_2 e nas adaptações a essa mesma fixação (Vance e Heichel, 1991), bem como as principais fontes de carbono utilizadas. Segundo Glenn *et al* (1980), Ronson *et al.*(1981) e Mackay *et al.* (1988) os bacteroides de *Rhizobium leguminosarum* evidenciaram, *in vitro*, boa capacidade para utilizar ácidos dicarboxílicos mas não açúcares. A forte inibição que a salinidade provocou na produtividade das plantas que obtêm o azoto por simbiose com microrganismos não ocorreu no crescimento vegetativo. Soussi *et al.* (1998) explicaram esta diferença pelo azoto fixado simbioticamente ser suficiente para cobrir as exigências azotadas do crescimento vegetativo, mas a necessidade adicional de azoto para o desenvolvimento e o crescimento dos órgãos reprodutivos tornar-se um esforço que estas plantas não conseguem comportar, implicando a diminuição da produtividade. Cordovilla *et al.* (1999^b) conduziram uma experiência com o objectivo de elucidar se plantas de *Pisum sativum* e de *Vicia faba* sob nutrição azotada inorgânica (NO_3^-) eram mais tolerantes à salinidade do que as inteiramente dependentes do azoto fixado simbioticamente. A inibição do crescimento registado para *Pisum sativum* foi menor nas plantas dependentes da fixação de N_2 . Estes autores concluíram que as plantas dependentes da fixação de N_2 nem sempre são mais sensíveis à salinidade do que as fertilizadas. Contudo, as conclusões foram baseadas em plantas com 30 dias de crescimento, ou seja, só se aplicam ao crescimento vegetativo e neste contexto são concordantes com os resultados obtidos neste capítulo. A menor inibição da salinidade no crescimento vegetativo poderá dever-se a um efeito semelhante de equilíbrio de pH ao observado na nutrição azotada mista. Por outro lado, a nutrição azotada compreende cerca de 70 % do total de iões absorvidos pela planta (Marschner, 1995). A obtenção de azoto a partir da fixação de N_2 poderá possibilitar a

menor actividade do sistema de absorção de nutrientes, o que em meios salinos se traduz na menor absorção de Na^+ e de Cl^- conferindo maior tolerância a plantas sob este tipo de nutrição.

Frequentemente, os estudos feitos sobre a influência da salinidade na nodulação de leguminosas relatam inibições mais ou menos pronunciadas. Elsheikh e Wood (1990) verificaram que a nodulação em *Cicer arietinum* foi completamente inibida a 61,6 mM NaCl, mesmo com a inoculação de uma estirpe de *Rhizobium* halotolerante. Num estudo posterior (1995), os mesmos autores concluem que embora a salinidade reduza a nodulação e a fixação de N_2 em plantas de soja inoculadas com estirpes de *Rhizobium* com diferentes halotolerâncias, as estirpes tolerantes possibilitaram maior fixação de N_2 . No entanto, Tu (1981) não obteve diminuição do número de nódulos em plantas de soja quando estas cresceram a 102 mM NaCl. Mohamad *et al.* (1989^b) seleccionaram estirpes de *Rhizobium meliloti* que cresciam a 528 mM para inoculação de populações de *Medicago sativa* também elas evidenciando tolerância salina (264 mM) e encontraram forte inibição da nodulação a 44 mM NaCl. Estes autores concluíram que deveria seleccionar-se primeiro a compatibilidade entre o hospedeiro e o microssimbionte em condições normais (ausência de sal) e posteriormente utilizar as estirpes de *Rhizobium* e os genótipos da planta hospedeira que evidenciassem maior capacidade de nodulação. Neste trabalho, a diferença no número de nódulos entre as plantas controlo e as sujeitas a 90 mM NaCl comprova a influência que a selecção de um isolado de *Rhizobium* com boa capacidade fixadora de N_2 e com tolerância ao nível da salinidade testada tem na nodulação de leguminosas a crescer sob condições salinas.

4.2 Semente

A comparação entre a composição iónica da semente e da parte vegetativa releva a menor concentração de iões em solução na semente, em especial de Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , NO_3^- e Cl^- (figura IV-9). Esta concentração reflecte a diferença entre a taxa de chegada e a taxa de assimilação dos iões. Na semente, a absorção iónica é melhor depreendida pela análise dos iões com baixa incorporação orgânica, como o Cl^- , o Na^+ e o K^+ . Assim, as concentrações de Cl^- nas plantas que utilizaram NO_3^- poderá, mais uma vez, ser o reflexo

da competição entre os dois aniões pelos locais de entrada existentes nas membranas das células da semente.

Nas plantas a crescer na presença de NaCl as concentrações de Na⁺ são cerca de 10 vezes inferiores às determinadas para a parte vegetativa. O que vem confirmar as observações de Greenway e Munns (1980), Gorham *et al.* (1986), Hajibagheri *et al.* (1987) e Marschner (1995). Estes autores descreveram que o Na⁺ é excluído dos órgãos vegetativos jovens e dos órgãos reprodutivos, independentemente da tolerância salina da planta. O Cl que se acumulou preferencialmente na parte aérea, também foi excluído das sementes, embora de forma menos eficiente. O Pi foi menos abundante na semente do que na parte aérea. Este facto é, aparentemente, contraditório com a bibliografia onde as sementes são tidas como órgãos ricos em fósforo, mas este encontra-se maioritariamente na forma de fitato. Assim, a menor concentração em Pi que a semente evidenciou em relação à parte aérea poderá reflectir apenas o Pi que ainda não foi incorporado em fitato.

O aumento generalizado da concentração de iões solúveis no fim do desenvolvimento estará certamente ligado à mobilização de nutrientes da parte vegetativa para a semente, cujo desenvolvimento ocorreu a partir dos 60 dias de crescimento. A variação dos incrementos de cada ião estará decerto dependente da concentração na parte vegetativa, bem como da taxa de remobilização específica de cada um (Pate e Flinn, 1977).

A grande translocação de nutrientes orgânicos e inorgânicos que ocorreu no fim do desenvolvimento das plantas em direcção à semente, disponibilizou os nutrientes e a energia necessários ao seu desenvolvimento, mas também alterou os mecanismos de tolerância à salinidade, ocorrendo a diminuição da exclusão de Na⁺ e Cl da parte vegetativa aérea da planta, deixando-a mais vulnerável à salinidade, mas mantendo baixas as concentrações de Na⁺ e Cl na parte reprodutiva.

5. Conclusão

A nutrição azotada influenciou o crescimento e a tolerância salina de *Pisum sativum*. A soma da intensidade dos processos que ocorrem em todas as células das plantas ao longo do seu desenvolvimento sob diferentes condições de crescimento torna-se visível no seu

crescimento e em especial na produtividade que foi o parâmetro que mais evidenciou essa tolerância.

Estas diferenças de tolerância só conseguem ser explicadas pela utilização de mais do que um mecanismo de tolerância à salinidade, cujas intensidades parecem ter variado ao longo do tempo. As concentrações de Na^+ , K^+ e Cl^- induzem a pensar que ocorreu a utilização conjunta dos três íons na regulação osmótica de toda a planta. O Na^+ acumular-se-ia preferencialmente nos vacúolos onde, em conjunto com o K^+ e o Cl^- , ajustaria osmoticamente este compartimento. Enquanto no citoplasma esse papel poderia ser desempenhado, pelo menos em parte, pelo K^+ . As quantidades determinadas dos três íons são suficientes para apoiar esta hipótese. O aumento de crescimento que plantas de *Pisum sativum* 'Resal' evidenciaram quando a crescer sob 30 mM de NaCl (capítulo II) comprovam, segundo Marschner (1995) e Grennway e Munns (1980) que o Na^+ pode substituir o K^+ em algumas das suas funções sem causar danos, como é o caso da regulação osmótica. Mas este mecanismo, *per se*, não explica as maiores concentrações de Na^+ nas raízes em relação à parte aérea ocorrida nas plantas sob nutrição com NO_3^- , facto que não se verifica nas plantas nutridas com NH_4^+ ou com NH_4NO_3 . Estas variações de distribuição do Na^+ pela planta só poderão ser explicadas por diferenças de exclusão de Na^+ da parte aérea. A assimilação de NO_3^- ocorre com consumo de prótons (Marschner, 1995), diminuindo a sua concentração no citosol. Se o Na^+ for transportado para os vacúolos por contratransporte com prótons, como foi referido por Ratner e Jacoby (1976), Yeo (1998), Barkla e Pantoja (1996), Katz *et al.* (1986), Matsumoto e Chung (1988) e Garbarino e Dupont (1988), através do tonoplasto das células radiculares, certamente, causará o aumento da sua acumulação na raiz e a diminuição da quantidade disponível para o transporte acrópeto. Este mecanismo só será válido se a maioria do NO_3^- for assimilada na raiz. Em concordância com este ponto de vista estão os resultados obtidos que revelaram a acumulação preferencial de NO_3^- nas raízes (figura IV-6), bem como a localização dos principais locais de acumulação de NO_3^- em *Pisum sativum*, descrito por Pate (1977) como sendo a raiz e a parte basal do caule e os pecíolos das folhas mais velhas. A menor acumulação de Na^+ na raiz e a maior acumulação de Na^+ nas folhas que as plantas fornecidas com NH_4^+ apresentam, poderá constituir mais um indício da ocorrência deste mecanismo (figura IV-5).

As plantas dependentes de N_2 fixado simbioticamente parecem ter um mecanismo de tolerância salina diverso das restantes. Sob 90 mM estas plantas acumulam muito menos iões do que as restantes. A autonomia da absorção de azoto inorgânico poderá permitir o menor influxo de iões através do plasmalema, mantendo em menor actividade os sistemas de absorção de iões. Este mecanismo possibilita a menor absorção de Na^+ e Cl^- que se traduz em menores concentrações destes dois iões nos tecidos vegetais e a menor inibição do crescimento vegetativo observado em plantas a crescer sob salinidade e dependentes da fixação de azoto diatómico.

Capítulo V

Influência da salinidade e da nutrição azotada no teor proteico de sementes de *Pisum sativum* L.

1. Introdução

1.1 Importância da semente

A semente permite a continuidade da espécie ao longo do tempo e do espaço, sendo especialmente importante em espécies anuais que não se propagam vegetativamente. Talvez por esse facto as plantas se empenhem tanto na sua concepção de modo a garantir as condições energéticas e nutricionais necessárias à germinação e ao estabelecimento das plântulas como organismos auto-suficientes. Em *Pisum sativum* os cotilédones contribuem activamente para o crescimento das plantas nas duas primeiras semanas que se seguem à germinação, perdendo neste período 88% do seu peso (Lovell, 1977). A riqueza das sementes em minerais e compostos orgânicos, como açúcares, amido, lípidos e proteínas tornam-nas alimentos de excelente valor nutritivo e talvez por esse motivo, cedo despertaram o interesse da sua utilização na alimentação. A importância ecológica que as

sementes têm na continuidade da espécie passa, assim, a ser compartilhada com interesses económicos ligados à maximização da produtividade.

Uma nutrição azotada deficiente acarreta efeitos marcantes na produtividade e na composição proteica das sementes, em especial das leguminosas, devido ao elevado conteúdo proteico que contêm. Estes factos, evidenciam a semente como o órgão mais apropriado para avaliar o estatuto nutricional das plantas em compostos azotados.

1.2 Composição da semente de *Pisum sativum*

As principais substâncias de reserva presentes nos cotilédones das ervilhas são o amido (20,7-55,4 % do peso seco) e as proteínas (20,1-29,1 % do peso seco). A quantidade de açúcares solúveis é relativamente pequena (3-12,9 %) e a fracção lipídica (1,4-4,8 % do peso seco) é muito menor do que noutras leguminosas (Maltese *et al.*, 1995). A proporção de amido é bastante variável e geralmente as sementes lisas contêm maior quantidade de amido do que as rugosas (Pate e Flinn, 1977). Os níveis de açúcares, principalmente sacarose, são inicialmente grandes, mas à medida que a semente matura os valores diminuem até 3 a 7 % do peso seco. A concentração de açúcares na semente é muito variável e depende de diferenças genéticas intra-específicas e de factores ambientais (Pate e Flinn, 1977). As proteínas presentes nas sementes são de dois tipos: metabólicas e de reserva. As primeiras estão relacionadas com as actividades da célula, incluindo a síntese do segundo tipo. As proteínas de reserva, que normalmente ocorrem em corpos proteicos, em conjunto com os hidratos de carbono e os lípidos, são sintetizados durante o desenvolvimento da semente. A seguir à germinação, quando se dá a sua quebra hidrolítica, fornecem a energia e a matéria prima necessárias ao desenvolvimento das plântulas.

As sementes de *Pisum sativum*, tal como as de muitas outras leguminosas, contêm uma proporção relativamente elevada de proteínas, cerca de 25 % (Maltese *et al.*, 1995; Pate e Flinn, 1977). Os cotilédones das leguminosas são caracterizados pela presença de duas classes principais de proteínas de reserva, as globulinas e as albuminas. Existe alguma incerteza na proporção de albuminas e de globulinas presentes nas ervilhas (Chambers *et al.*, 1992). De um modo geral, as albuminas constituem 15 a 50 % das proteínas da

semente (Grant *et al.*, 1976; Murray, 1979; Murray e Vairinhos, 1982; Casey *et al.*, 1993; Pasqualini *et al.*, 1991; Schroeder, 1984). Estas variações são resultantes de diferenças genéticas existentes na espécie e das condições ambientais onde as plantas cresceram. As albuminas incluem inibidores de proteases, lipoxigenases, lecitinas, e albuminas específicas (PA1 e PA2), algumas das quais são suficientemente abundantes para serem detectadas por electroforese em geles de poliacrilamida (Casey *et al.*, 1993).

As globulinas mais abundantes são a vicilina e a legumina. A legumina é uma das principais proteínas das sementes de *Pisum sativum* (1,2-22,2 % do peso seco - Maltese *et al.*, 1995). A massa molecular da legumina foi descrita por vários autores como estando entre 330 e 450 kDa (Schwenke, 1990, Matta *et al.*, 1981 e Croy *et al.*, 1979). Os pares de subunidades unidos por ligações de bisulfito com massa molecular de 54 kDa constituem a maior parte da legumina. Adicionalmente, também ocorrem pares de subunidades com massas que variam entre 35.000 e 58.000 que ao associarem-se de diferentes modos originam pelo menos três formas moleculares distintas de legumina separáveis em geles não dissociativos (Matta *et al.*, 1981; Schwenke, 1990). Matta *et al.* (1981) a partir dos resultados de electroforeses sob condições conservativas, desnaturantes ou redutoras, concluíram que existem 5 pares de subunidades diferentes com massas moleculares de 58.000, 55.000, 54.000 e 35.000 denominadas L1, L2, L3, L4 e L5, respectivamente. As massas moleculares das subunidades acídicas foram de 43.000, 35.000, 38.500, 37.500, 35.000 e 24.500 e as massas moleculares das subunidades basídicas foram de 21.300, 21.9000, 21.900, 22.700, 21.000 e 20.700. A associação de diferentes pares de subunidades originou quatro moléculas de legumina diferentes.

A vicilina de *Pisum sativum* é extremamente heterogénea, consistindo num conjunto de polipeptídeos de massa molecular entre 12.000 e 70.000 (Thomson *et al.*, 1978). Tucci *et al.* (1991) encontraram idênticas massas moleculares nas subunidades de vicilina isoladas de *Vicia faba* (65,7 a 15,2 kDa). Os polipeptídeos de maior peso molecular (65,7 a 42,8 kDa) foram os mais abundantes, aparecendo os restantes (37,2-15,2 kDa) em muito menor quantidade. A estrutura da proteína integral, geralmente aceite, é a de um trímero de subunidades na maioria das vezes com massa próxima de 50 kDa.

Croy *et al.* (1980) isolaram uma terceira globulina das sementes de *Pisum sativum*, a convicilina. O seu nome deriva da homologia entre esta proteína e a vicilina. De facto, a convicilina tem uma composição polipeptídica muito semelhante à vicilina, mas contém

uma sequência adicional nas subunidades e por isso estas têm um Mr entre 70.000 e 75.000 (Casey, 1993; Pasqualini *et al.*, 1991; Tucci, 1991).

Os perfis proteicos das sementes da subfamília Papilionoideae evidenciam, caracteristicamente, polipeptídeos com 34 a 35 kDa e 23 a 25 kDa. Estas moléculas são as albuminas predominantes nas sementes de *Pisum sativum* (Murray, 1979; Murray e Vairinhos, 1982; Croy, 1984; Pasqualini, 1991). Em *Vicia faba* e em *Pisum sativum*, foram encontradas, ainda na fracção de albuminas, dois polipeptídeos pouco abundantes com 91 e 56 kDa. (Pasqualini *et al.*, 1991; Murray, 1979).

Nas plantas existem muitas proteínas polimórficas, particularmente nas sementes. Muita desta heterogeneidade tem origem genética e possibilita a identificação intra-específica de diferentes variedades ou cultivares (Cooke, 1995; Bonetti *et al.*, 1995; Dinelli e Bonetti, 1992^a; Dinelli e Bonetti, 1992^b).

1.3 Efeitos do “stress” salino na síntese proteica

A salinidade do solo é um importante “stress” ambiental que afecta de forma marcante a produtividade. O progresso no desenvolvimento de variedades tolerantes ao sal tem sido muito lento devido ao conhecimento limitado dos mecanismos subjacentes à tolerância. Segundo Yeo (1994; 1998), o aumento da tolerância salina só poderá ser conseguido pelo estudo dos processos fisiológicos mais sensíveis à salinidade e que, por essa razão, limitam a tolerância geral. O metabolismo proteico é um dos processos fortemente afectado pela salinidade. Todo o processo da síntese proteica é há muito identificado como um elo fraco na cadeia da tolerância salina (Weber *et al.*, 1977; Gibson *et al.*, 1984). A síntese proteica tem necessidade de uma homeostasia iónica que favoreça o K⁺ em relação ao Na⁺ (Leigh e Wyn-Jones, 1984), mesmo em plantas com elevada tolerância salina como as halófitas (Yeo, 1998; Greenway e Munns, 1980; Hall e Flowers, 1973).

Em linhas celulares de *Nicotiana tabacum* L. tolerantes a “stress” salino e hídrico foi identificada uma nova proteína com 26 kDa, denominada osmotina (Singh *et al.*, 1987). Pensa-se que o papel desta proteína seja o de proporcionar ajuste osmótico celular, por facilitar a acumulação de outros solutos ou por fornecer certas alterações metabólicas celulares que de algum modo poderão ser úteis ao ajuste osmótico (Singh *et al.*, 1987).

Uma proteína com idêntica massa molecular também foi encontrada em tecido caloso de milho a crescer sob condições salinas (Ramogopal, 1986). Em *Oryza sativa* os genótipos tolerantes ao sal têm diferentes perfis proteicos quando cresceram na presença ou na ausência de NaCl. As partes aéreas dos genótipos tolerantes ao sal possuem uma proteína com 28 kDa e a quantidade desta proteína aumentou com o incremento da concentração de NaCl no meio de cultura (Dubey, 1994). Em cultivares de arroz sensíveis ao sal algumas das principais proteínas desaparecem com o aumento de salinidade e surgem proteínas novas (Dubey, 1994). Em *Citrus* a proteína associada com a tolerância ao sal tem 25 kDa (Ben-Hayyim, 1989) e concentrações de 1% de NaCl são suficientes para estimular a sua síntese. A maioria das proteínas aumentou em linhas celulares de tomate adaptadas ao sal. Pelo contrário, em linhas celulares de *Citrus* a crescerem sob condições salinas muitas proteínas não foram detectadas. Estas observações indicam que as mudanças induzidas pela salinidade são específicas e que diferentes proteínas estão associadas com a tolerância à salinidade em diferentes espécies.

Na maioria dos casos, a salinidade diminui o nível proteico como resultado da diminuição da síntese proteica causada pela menor disponibilidade de aminoácidos, da desnaturação das enzimas envolvidas na síntese de proteínas e aminoácidos e do aumento da actividade das enzimas hidrolíticas (Dubey, 1994). No entanto, em certos casos é notado um aumento nos níveis de proteínas (Dubey e Runi, 1987; Joshi, 1987), possivelmente devido ao aumento da síntese de novas proteínas induzidas pelo sal. (Dubey, 1994).

1.4 Objectivos

Este capítulo analisa o efeito da salinidade e da nutrição azotada na composição proteica da semente de *Pisum sativum*. A persecução deste objectivo foi alcançada pela quantificação das proteínas totais e pela comparação dos perfis proteicos em geles de poliacrilamida.

2. Material e Métodos

Neste capítulo quantificou-se a quantidade total de proteínas presente em sementes de *Pisum sativum* e procedeu-se à separação dos seus polipeptídeos por SDS-PAGE.

2.1 Extracção das proteínas

Durante a colheita as sementes foram congeladas em azoto, reduzidas a pó e congeladas a -30°C. Após o descongelamento das amostras, procedeu-se à sua homogeneização em tampão de extracção. O tampão de extracção escolhido foi o descrito por Matta *et al.* (1981), 50 mM de tampão borato de sódio, pH 8,0, ao qual se adicionaram vários inibidores de proteases (PMSF 1mM, EDTA 2mM, Leupeptina $1,9 \cdot 10^{-3}$ mM, Benzamidina 9 mM, Pepstatina A $6,25 \cdot 10^{-3}$ mg mL⁻¹ e Aprotinina $2,3 \cdot 10^{-2}$ mg mL⁻¹). Após a homogeneização, feita a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado para posterior quantificação das proteínas e para separação dos polipeptídeos por SDS-PAGE.

2.2 Quantificação das proteínas totais

O teor proteico total foi determinado pelo método de Lowry (Lowry *et al.*,1951) modificado (DC protein Assay, Bio-Rad). Este método minimiza a interferência de várias substâncias correntemente presentes nos tampões de extracção (como o EDTA e o NaOH presentes no tampão de extracção usado). A quantificação foi efectuada por comparação da absorvância a 700 nm entre as amostras e soluções padrão de BSA (albumina do soro de bovino) com concentrações conhecidas.

2.3 Electroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes

Os polipeptídeos presentes na semente foram separados por electroforese vertical em geles de poliacrilamida utilizando SDS como desnaturante (SDS-PAGE). A melhor separação e resolução das bandas foi conseguida em geles resolventes cuja concentração de

poliacrilamida na parte superior era de 12% e na inferior de 18%. Os mini-geles com 0,75 mm de espessura e contendo 15 poços foram carregados ou com 15 μ L de amostra, fervida durante 1,5 minutos com SDS (0,1%) e misturada com tampão de tratamento (125 mM Tris-Cl, 4% SDS, 20% glicerol, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) (Chrambach e Rodbard, 1988) ou com 5 μ L de padrão de proteínas. Foram utilizados dois padrões diferentes, um com proteínas de massa molecular compreendidas entre 47 e 205 kDa (Prestained SDS-PAGE standards, Bio-Rad) para a parte do gel de 12% e outro entre 3,4 e 38,6 kDa para a parte do gel de 18% (Kaleidoscope polypeptide standards, Bio-Rad). O azul de bromofenol, presente no tampão de tratamento, foi utilizado como marcador da frente de migração do gel. A electroforese foi efectuada numa tina para mini-geles contendo tampão (25 mM Tris-Cl, 192 mM glicina, 0,1%, pH 8,3) (Chrambach e Rodbard, 1988), a uma corrente constante de 40 mA (20 mA para cada gel), até o marcador da frente de migração se encontrar a 0,5 cm do limite inferior do gel.

Para a visualização das bandas foi utilizado o Azul de “Coomassie” (Coomassie Brilliant Blue R-250 Kit, Bio-Rad). Os geles foram corados durante 10 a 14 horas e seguidamente colocados em solução de descoloração até que o contraste entre as bandas e o fundo do gel fosse máximo. A secagem foi efectuada num secador de geles a 60°C durante 3 a 6 horas, consoante o número de geles que era seco simultaneamente.

Em cada gel foi medida a distância de migração de cada uma das bandas e calculada a sua migração relativa. A massa molecular dos polipeptídeos presentes nas amostras foi determinada através da equação de regressão linear entre a migração relativa dos marcadores proteicos e o logaritmo da sua massa molecular.

2.4 Análise estatística

As médias das proteínas totais foram comparadas por análise de variância de factor único. A interacção entre a salinidade e o tipo de nutrição azotada foi determinada através da análise de variância de factor duplo com repetição. Nas duas análises estatísticas a probabilidade de erro admitida foi <0,05 e o tamanho da amostra foi doze.

3. Resultados

Neste capítulo é avaliada a influência da nutrição azotada e da salinidade na fracção proteica da semente. A avaliação é feita através do conteúdo proteico total e dos perfis de polipeptídeos obtidos por SDS-PAGE.

3.1 Proteínas totais

A análise da figura V-1 evidencia a salinidade e a nutrição azotada como factores condicionantes da acumulação de proteínas na semente de *Pisum sativum*. Sob condições não salinas a nutrição com amónio proporcionou a acumulação de mais 64% de proteínas do que os restantes tratamentos azotados. No entanto, a interacção da salinidade com a nutrição azotada alterou, por completo, este cenário. A quantidade de proteínas aumentou em três dos quatro tratamentos azotados para níveis semelhantes aos anteriormente facultados pelo amónio. As sementes das plantas dependentes da fixação simbiótica de N_2 constituem a excepção. Nestas a salinidade causou uma diminuição significativa do conteúdo proteico.

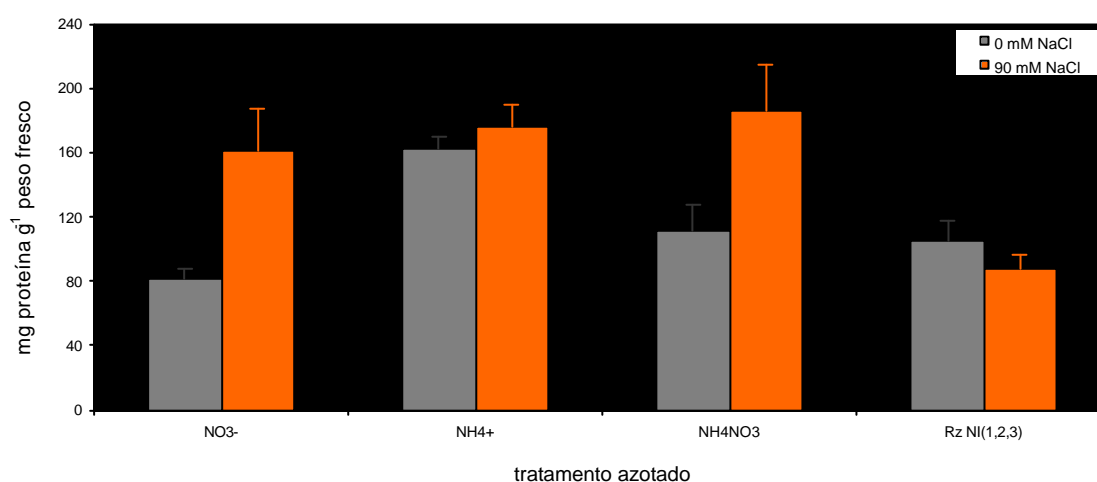


Figura V1: Proteínas extraídas de sementes de plantas de *Pisum sativum* 'Resal' cultivadas 75 dias sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada.. Os valores são médias (+ DP) de 12 réplicas.

3.2 Análise electroforética da fracção proteica

As proteínas totais das sementes de *Pisum sativum* analisadas por SDS-PAGE, evidenciaram perfis polipeptídicos com um padrão complexo (tabela V-1, figura V-2). Em todas as amostras os polipeptídeos mais abundantes foram cinco, com massas moleculares de 62,1, 39,3, 33,4, 23,4 e 4,8 kDa (polipeptídeos assinalados na tabela V-1 com “++”). Existem outros cuja intensidade da banda é menor, mas cuja presença é muito frequente, é o caso dos polipeptídeos de 90,6, 53,3, 40,5, 28,8, 16,2, 14,8, 13,6, 10,5, 9,5, 7,0, 6,4 e 5,4 kDa (polipeptídeos assinalados na tabela V-1 com “+”).

A salinidade provocou maiores diferenças nos perfis polipeptídicos do que a nutrição azotada. Sob condições salinas os perfis polipeptídicos apenas evidenciaram o desaparecimento de uma banda com 5,2 kDa. Independentemente do tratamento azotado a salinidade induziu o aparecimento de três bandas (30,1, 27,9 e 27,3 kDa) e duas (32,8 e 12,4 kDa) estiveram ausentes da maioria das amostras sem influência salina (tabela V-1 e figura V-2).

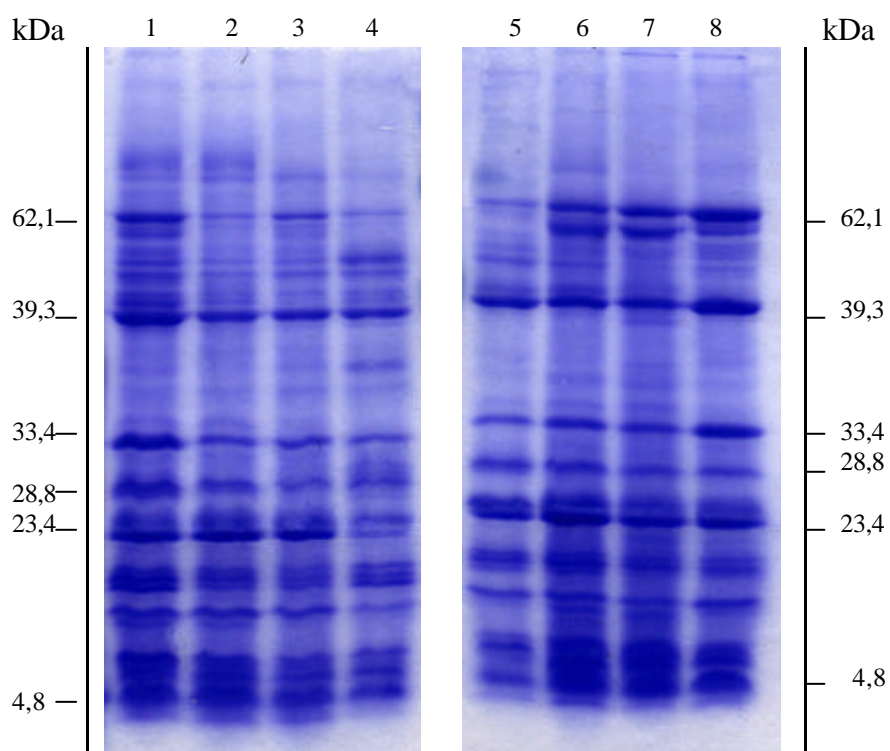


Figura V-2: Perfis polipeptídicos separados por SDS-PAGE, presentes na fracção proteica de sementes de *Pisum sativum* cv. Resal, após 75 dias de crescimento, sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada: linha 1- 90 mM NaCl e NO_3^- ; linha 2- 90 mM NaCl e NH_4^+ ; linha 3- 90 mM NaCl e NH_4NO_3 ; linha 4- 90 mM NaCl e *Rhizobium*, linha 5- 0 mM NaCl e NO_3^- ; linha 6- 0 mM NaCl e NH_4^+ ; linha 7- 0 mM NaCl e NH_4NO_3 ; linha 8- 0 mM NaCl e *Rhizobium*.

4. Discussão

4.1 Proteínas totais

Embora a síntese proteica seja reconhecida como um processo celular com exigências iônicas muito precisas e que favorecem o K^+ em relação ao Na^+ (Yeo, 1998; Greenway e Munns, 1980), os resultados evidenciam que a salinidade pode provocar o aumento do conteúdo proteico (Dubey, 1994). São vários os autores que observaram variações no conteúdo proteico em *Pisum sativum*. Estas alterações tiveram origem em vários factores que incluem a localização (Matheus e Arthur, 1985; Igbasan *et al.*, 1996), nível e forma de azoto disponível (Cowan, 1979), ano de colheita (Holt e Sosulski, 1979) e genótipo (localização (Matheus e Arthur, 1985; Kalloo, 1993). Neste capítulo, a influência da salinidade provocou um aumento do conteúdo proteico da semente entre 7,7 e 98%, com excepção das plantas dependentes da fixação simbiótica de N_2 , onde ocorreu uma diminuição de 17%. O aumento da síntese proteica em diversas partes da planta foi também observado em *Oryza sativa*, *Vigna unguiculata* L., *Pisum sativum* e *Cajanus cajan* L. Huth. (Dubey e Rani, 1989; Joshi, 1987; Dubey, 1994). Dubey e Rani (1989), explicaram este aumento como sendo devido à síntese de novas proteínas e ao aumento da síntese das preexistentes.

4.2 Análise electroforética da fracção proteica

Os polipeptídeos mais abundantes em todas as amostras (62,1, 39,3, 33,4 e 23,4 kDa) deverão corresponder a subunidades das proteínas mais abundantes nas sementes de *Pisum sativum*, a vicilina, a legumina e, possivelmente, uma albumina. Matta *et al.* (1981) observaram que os pares de subunidades de legumina de *Pisum sativum* mais abundantes tinham uma massa molecular de 54 kDa. No entanto, apareceram outras com 58, 55 e 35 kDa. Croy *et al.* (1979) registaram massas moleculares de 41, 39, 22,3 e 19,4 kDa como subunidades da legumina de *Pisum sativum* 'Feltham First', sendo os dois polipeptídeos de

maior massa as subunidades α e os menores as subunidades β , o que resultará em pares de subunidades $\alpha\beta$ entre 58,4 e 63,3 kDa. Em sementes de *Pisum sativum* 'Greenfeast' da linha PI/G 086, Higgins e Spencer (1984) obtiveram duas bandas com massas moleculares de 40 e 20 kDa e classificaram-nas como sendo subunidades de legumina. A banda de 62,1 kDa existente na semente de *Pisum sativum* 'Resal' coaduna-se bem com este intervalo, podendo representar o par de subunidades $\alpha\beta$ de legumina mais frequente.

As vicilinas de *Pisum sativum* e de *Vicia faba* são extremamente heterogêneas consistindo num conjunto de polipeptídeos de massas moleculares entre 12 e 76 kDa (Thomson *et al.*, 1978; Tucci *et al.*, 1991; Pasqualini *et al.*, 1991; Higgins e Spencer, 1981). Bailey e Boulter (1972) descobriram que a vicilina de *Vicia faba* era composta por quatro subunidades com massas moleculares de 66, 60, 56 e 36 kDa. Na mesma espécie Derbyshire (1976) identificou três polipeptídeos com massas moleculares de 52, 49 e 46 kDa como sendo subunidades da vicilina. Em *Phaseolus vulgaris*, Bollini e Chrispeels (1978) chegaram à conclusão que a vicilina é composta por três subunidades de massa molecular diferente (52, 49 e 46 kDa). Pasqualini *et al.* (1991) interpretaram os polipeptídeos com 66, 44,7 e 32,3 kDa como sendo subunidades da vicilina de *Vicia faba*. Na mesma espécie Tucci *et al.* (1991) obtiveram quatro polipeptídeos mais abundantes com 65,7, 48,2, 46 e 42,8 kDa e dezassete em menor quantidade, classificando-os como sendo subunidades de vicilina. O perfil polipeptídico do conteúdo proteico de sementes maduras de *Pisum sativum*, obtido por SDS-PAGE sob condições redutoras, obtido por Higgins e Spencer (1981) consistia em 14 bandas, com massas moleculares entre 75 e 12 kDa e os polipeptídeos com 13, 22, 29, 47, 52 e 76 kDa foram classificadas como componentes da vicilina. À luz do que foi referido, os polipeptídeos com 39,3 e 33,4 poderão ser identificados como subunidades de vicilina mais frequentes e os polipeptídeos com massas moleculares de 49, 46,5, 44,3, 41,4, 40,5, 38,6, 38,2 e 35,8, sempre presentes em todos os tratamentos, como subunidades mais raras. A massa molecular das subunidades de convicilina são frequentemente descritas como estando entre 70 e 75 kDa (Tucci *et al.*, 1991; Pasqualini, 1991; Casey, 1993). Nos perfis polipeptídicos obtidos neste capítulo a banda de 72,1 kDa é a única que está compreendida neste intervalo e apenas ocorre nas plantas sob nutrição azotada inorgânica.

Uma característica da fracção de albuminas em várias leguminosas, incluindo *Pisum sativum* é a ocorrência frequente dos principais polipeptídeos nos intervalos entre 23 e 25

kDa e entre 34 e 35 kDa (Murray, 1979; Murray e Vairinhos, 1982; Croy *et al.*, 1984; Schroeder, 1984). No entanto, frequentemente aparecem polipeptídeos com outras massas moleculares. Murray *et al.* (1979) encontrou duas bandas com 91 e 56 kDa e classificou-as como albuminas. Os perfis polipeptídicos obtidos por Pasqualini *et al.* (1991) e por Tucci *et al.* (1991) evidenciaram bandas inferiores a 23 kDa, cuja massa foi difícil de determinar devido à incipiente separação dos polipeptídeos de baixa massa molecular. Schroeder *et al.* (1984) comparou os perfis polipeptídicos da fracção de albuminas em sementes de várias espécies de *Pisum*. Em todas as espécies ocorreram várias bandas com massas moleculares compreendidas entre 30 e menos de 8 kDa. As albuminas mais abundantes foram as de 22 e 8 kDa. Em algumas espécies, incluindo *Pisum sativum*, ocorreu uma banda com 92 kDa, embora com fraca intensidade. Os resultados dos trabalhos descritos levam-nos a supor que a maioria das bandas com massa molecular inferior a 30 kDa e a banda de 90,6 kDa, visíveis nos perfis polipeptídicos apresentados neste capítulo, poderão ser albuminas. As duas bandas mais intensas têm 23,4 e 4,8 kDa. A primeira tem uma massa semelhante a uma das duas albuminas mais abundantes determinada por Schroeder (1984) cuja massa era de 22 kDa. No entanto, a massa da segunda é quase metade da obtida por Schroeder (1984).

As referências bibliográficas descrevem a salinidade como geradora de alterações na síntese proteica. Estas alterações dependem da duração e do grau de “stress” e são manifestadas por aumentos ou diminuições do conjunto de proteínas já existente ou pelo aparecimento de novas proteínas (Hurkman e Tanaka, 1987; Ben-Hayyim *et al.*, 1989; Dubey e Rani, 1987; Dybey e Sharma, 1990; Mittal e Dubey, 1991). O aparecimento de proteínas com massas moleculares entre 25 e 30 kDa parece estar associado ao “stress” hídrico e salino (Dubey, 1994). Em *Nicotiniana tabacum* e em *Zea mays* detectou-se uma proteína com 26 kDa (Singh *et al.*, 1987; Ramogopal, 1986), em *Oryza sativa* a massa molecular da proteína detectada era de 28 kDa (Dubey e Rani, 1989) e em *Citrus* a proteína associada ao “stress” tinha uma massa de 25 kDa (Ben-Hayyim, 1989). Estes relatos vêm de encontro aos resultados obtidos neste capítulo. Sob condições salinas, foram detectados três novos polipeptídeos (30,1, 27,9 e 27,3 kDa) e o aparecimento de duas bandas em todos os tratamentos azotados que na ausência de NaCl só apareceram nas plantas sob nutrição de amónio (12,4 kDa) ou de nitrato de amónio (32,8 kDa). Destes cinco polipeptídeos, o único que se afasta deste intervalo é o de 12,4 kDa (figura V-2). As

novas proteínas induzidas pela salinidade poderão conferir um aumento da tolerância salina aos organismos, alargando a sua sobrevivência em condições adversas (Dubey, 1994).

5. Conclusão

Embora a síntese proteica seja, de um modo geral, reconhecida como uma actividade celular sensível ao sódio (Yeo, 1998; Dubey, 1994), com excepção das plantas dependentes de fixação simbiótica de N_2 , a salinidade provocou o aumento do conteúdo proteico nas sementes. Facto que não será alheio à manutenção de baixas concentrações de Na^+ e Cl^- neste órgão (capítulo IV).

Os perfis dos polipeptídeos mais abundantes não foram muito influenciados pelas condições de crescimento impostas. No entanto, a salinidade induziu o aparecimento de novos polipeptídeos que poderão conferir maior tolerância deste órgão ao aumento dos níveis de Na^+ e Cl^- que foram detectados nas plantas sob 90 mM de NaCl.

Assim, a salinidade não alterou significativamente a qualidade proteica e aumentou a fracção proteica na semente. No entanto, a quantidade total de proteínas de reserva por planta poderá ser menor, principalmente sob nutrição de amónio e nitrato de amónio, onde a salinidade provocou uma redução da produtividade bastante acentuada (capítulo IV).

Em condições controladas é possível o cultivo de *Pisum sativum* cv. Resal sob 90 mM de NaCl sem grandes diminuições de produtividade, desde que à planta sejam fornecidos níveis adequados de azoto na forma de nitrato. As plantas dependentes do azoto fixado simbioticamente tiveram menor produtividade, mas esta não foi tão afectada pela salinidade como as dependentes de amónio e de nitrato de amónio. Fica por saber se a obtenção de azoto por fixação simbiótica do N₂ em conjunto com a aplicação de menores níveis de nitrato poderá, sob condições salinas, resultar numa produtividade a níveis semelhantes aos proporcionados pela nutrição inorgânica com a vantagem de diminuir a contaminação de águas superficiais e subterrâneas e de implicações associadas, causando, assim, menor perturbação no meio ambiente.

Capítulo VI

Conclusões finais

Pisum sativum ocupa um lugar especial na pesquisa científica devido a ter sido a espécie que Mendel utilizou nos seus estudos genéticos. Algumas das características da ervilha tornam-na um bom material de pesquisa: as sementes germinam rapidamente; a espécie contém uma variabilidade genética grande (Davies, 1993; Wang e Hedley, 1993); tem um ciclo de vida relativamente curto e estabelece um relação simbiótica com *Rhizobium*.

Esta espécie é muito sensível às condições ambientais, registando-se, frequentemente, variações elevadas de produtividade sem que as causas sejam muitas vezes identificadas (Pate, 1977; Doré, 1998). Esta situação reflecte o parco conhecimento dos factores que condicionam o seu desenvolvimento e são um estímulo para a continuação da sua investigação.

As quatro cultivares estudadas comprovam *Pisum sativum* com sendo uma espécie moderadamente tolerante ao sal, segundo a classificação de Francois e Maas (1994). 'Resal' também confirma a classificação de Marschner (1995), que dividiu as plantas em quatro grupos de acordo com as diferentes respostas de crescimento ao sódio. *Pisum sativum* é englobada no grupo B. As espécies pertencentes a este grupo podem substituir uma pequena proporção de K^+ por Na^+ com estimulação incipiente do crescimento. Entre as cultivares estudadas, 'Resal' aparece como a mais indicada para o cultivo sob condições salinas. O seu crescimento a 90 mM NaCl não foi significativamente afectado em comparação com 0 mM e a sua tolerância talvez possa ser aumentada se a obtenção de

azoto não for tão prejudicada pela salinidade e se as estratégias de adaptação à salinidade forem melhor conhecidas.

Parte da resposta à primeira hipótese (possibilidade do aumento de tolerância de *Pisum sativum* por uma fonte azotada menos sensível à salinidade), implica a existência de *Rhizobium* halotolerante compatível com a espécie vegetal em estudo. A selecção de isolados de *Rhizobium* de vários locais permitiu concluir que a tolerância salina das populações de *Rhizobium* são o reflexo das condições salinas do *habitat* que ocupam e evidenciam a adaptação ao meio ambiente que colonizam, com excepção da população da Costa Nova. Apenas os isolados de *Rhizobium* provenientes de um local que durante parte do ano está sujeito a stress hídrico evidenciaram tolerância à salinidade, possivelmente porque as adaptações à secura lhe confirmam, simultaneamente, tolerância à salinidade, facto já mencionado por Yeo (1994) e por Bordeleau e Prevost (1994). O estudo da tolerância salina dos isolados provenientes dos restantes locais revelou a sua sensibilidade, indicando que estão desprovidos dos mecanismos que lhes conferem tolerância ao sal.

A avaliação da eficiência da simbiose entre alguns isolados ou estirpes de *Rhizobium* e plantas de *Pisum sativum* da cv. Resal abriu boas perspectivas para o estabelecimento de uma simbiose efectiva sob condições de salinidade moderada, devido à obtenção de três isolados que, simultaneamente, proporcionaram maior crescimento da parte aérea e toleraram salinidades de 400 mM.

A restante parte da resposta à primeira hipótese poderá ser dada pelo estudo da influência da nutrição azotada inorgânica no crescimento de *Pisum sativum* sob condições salinas. Os resultados obtidos evidenciaram que a nutrição azotada influenciou o crescimento e a tolerância salina de *Pisum sativum*. A soma da intensidade dos processos que ocorrem em todas as células das plantas ao longo do seu desenvolvimento sob diferentes condições de cultura torna-se visível no seu crescimento e em especial na sua produtividade que foi o parâmetro que mais evidenciou essa tolerância.

O conhecimento das estratégias de adaptação à salinidade, a segunda questão anteriormente levantada, como meio de aumentar a tolerância salina de *Pisum sativum* levou a concluir que as diferenças de tolerância só conseguem ser explicadas pela utilização de mais do que um mecanismo de tolerância à salinidade, cujas intensidades parecem variar ao longo do tempo. As concentrações de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ induzem a pensar que ocorreu a utilização conjunta destes três iões na regulação osmótica de toda a planta.

Ao acumular-se preferencialmente nos vacúolos, o Na^+ , em conjunto com o K^+ e o Cl^- , ajustaria osmoticamente este compartimento. Enquanto, no citoplasma esse papel poderia ser desempenhado, pelo menos em parte, pelo K^+ . As quantidades determinadas dos três íons são suficientes para apoiar esta hipótese. O aumento de crescimento que as plantas desta cultivar evidenciaram quando a crescer sob 30 mM de NaCl (capítulo II) comprovam, segundo Marschner (1995) e Greenway e Munns (1980), que o Na^+ pode substituir o K^+ em algumas das suas funções sem causar danos, ou seja, na regulação osmótica. Mas este mecanismo, *per se*, não explica as maiores concentrações de Na^+ nas raízes em relação à parte aérea ocorrida nas plantas sob nutrição com NO_3^- , facto que não se verifica nas plantas nutridas com NH_4^+ ou com NH_4NO_3 . Estas variações de distribuição do Na^+ pela planta só poderão ser explicadas por diferenças de exclusão de Na^+ da parte aérea. A assimilação de NO_3^- ocorre com consumo de prótons (Marschner, 1995), diminuindo a sua concentração no citosol. Se o Na^+ for transportado para os vacúolos por contratransporte com prótons, como referido por Mennen *et al.* (1990) através do tonoplasto das células radiculares, certamente, causará o aumento da sua acumulação na raiz, diminuindo a quantidade disponível para o transporte acrópico. Este mecanismo só será válido se a maioria do NO_3^- for assimilada na raiz. Em concordância com este ponto de vista estão os resultados expressos no capítulo IV, conquanto evidenciaram a acumulação preferencial de NO_3^- nas raízes (figura IV-6), bem como a localização dos principais locais de acumulação de NO_3^- em *Pisum sativum*, descritos por Pate (1977) como sendo a raiz, a parte basal do caule e os pecíolos das folhas mais velhas. A menor acumulação de Na^+ na raiz e a maior acumulação de Na^+ nas folhas que as plantas fornecidas com NH_4^+ apresentam, poderá ser mais um contributo que apoie a ocorrência deste mecanismo (figura IV-5).

As plantas dependentes de N_2 fixado simbioticamente parecem ter um mecanismo de tolerância salina diverso das restantes. Sob 90 mM estas plantas acumulam muito menos íons do que as restantes. A autonomia da absorção de azoto inorgânico poderá permitir o menor influxo de íons através do plasmalema, mantendo em menor actividade os sistemas de absorção de íons. Este mecanismo possibilitaria, sob condições salinas, a menor absorção de Na^+ e Cl^- explicando as menores concentrações destes dois íons e de vários outros e explicando a menor inibição da salinidade no crescimento vegetativo destas plantas.

O conteúdo proteico, devido à grande proporção de átomos de azoto, constitui um bom método de avaliar o efeito que a salinidade e o tipo de nutrição azotada têm no estado azotado de *Pisum sativum*. A semente, contendo 60 a 70 % do azoto total absorvido pela planta (Pate, 1977), será o órgão mais apropriado para essa avaliação.

Embora a síntese proteica seja, de um modo geral, reconhecida como uma actividade celular sensível ao sódio (Yeo, 1998; Dubey, 1994), com excepção das plantas dependentes de fixação simbiótica de N_2 a salinidade provocou o aumento do conteúdo proteico nas sementes. Facto que não será alheio à manutenção de baixas concentrações de Na^+ e Cl^- neste órgão (capítulo IV). Os perfis dos polipeptídeos mais abundantes não foram muito influenciados pelas condições de crescimento impostas. Contudo, a salinidade induziu o aparecimento de novos polipeptídeos que poderão conferir a este órgão maior tolerância ao NaCl. Assim, a salinidade não alterou significativamente a qualidade proteica da semente e aumentou a sua fracção proteica. No entanto, a quantidade total de proteínas de reserva por planta poderá ser menor, principalmente sob nutrição de amónio e nitrato de amónio, onde a salinidade provocou uma redução da produtividade bastante acentuada (capítulo IV).

Em conclusão, este trabalho facultou o melhor conhecimento das respostas de *Pisum sativum* à salinidade, bem como de alguns dos factores que condicionam estas respostas. Permitindo afirmar que em condições controladas é possível o cultivo de *Pisum sativum* 'Resal' em 90 mM de NaCl sem grandes diminuições de produtividade, desde que à planta sejam fornecidos níveis adequados de azoto na forma de nitrato. As plantas dependentes do azoto fixado simbioticamente tiveram menor produtividade, mas esta não foi tão afectada pela salinidade como as dependentes de amónio e de nitrato de amónio.

Todavia, este trabalho também suscitou algumas questões. Será que o estudo da tolerância salina de outras cultivares de *Pisum sativum* poderá dilatar o intervalo de tolerância da espécie actualmente conhecido? Será que a selecção de novos isolados de *Rhizobium* poderá permitir o aumento da eficiência de nodulação em *Pisum sativum*? Quais os solutos orgânicos que as células de *Pisum sativum* acumulam de modo a ajustarem osmoticamente o citoplasma? Qual o gradiente de concentração de sódio e cloro através do tonoplasto em cada um dos órgãos da planta? Qual a resposta das plantas, sob stress salino a uma nutrição mista de azoto fixado simbioticamente e de menores níveis de nitrato?

Bibliografia

Abd-Alla M.H., Vuong T.D. e Harper J.E. (1998). Genotypic differences in dinitrogen fixation response to NaCl stress in intact and grafted soybean. *Crop Science*, **38** (1): 72-77.

Abdul-Kadir S.M. e Paulsen G.M. (1982). Effect of salinity on nitrogen metabolism in wheat. *Journal of Plant Nutrition*, **5**: 1141-1151.

Alfocea F.P., Estan M.T., Caro M. e Bolarin M.C. (1993). Response of tomato cultivars to salinity. *Plant and Soil*, **150**: 203-211.

Allen S.G. e Smith J.A.C. (1986). Ammonium nutrition in *Ricinus communis*: Its effect on plant growth and the chemical composition of the whole plant, xylem and phloem saps. *Journal of Experimental Botany*, **37**: 1599-1610.

Allen S.G., Dobrenz A.K. e Bartels P.G. (1986). Physiological response of salt tolerant and non tolerant alfalfa to salinity during germination. *Crop Science*, **26**: 1004-1008.

Antmann A., Laurie S., Leigh R.A. e Sanders D. (1997). Multiple inward channels provide flexibility in Na⁺/K⁺ discrimination at the plasma membrane of barley suspension culture cells. *Journal of Experimental Botany*, **48**: 481-497.

Arimura G. e Hiroshima Y. (1996). Determination of levels of NO₃⁻, NO₂²⁻, and NH₄⁺ ions in leaves of various plants by capillary electrophoresis. *Plant and Cell Physiology*, **37**(6): 878-880.

Ashraf M. e Waheed A. (1990). Screening of local/exotic accessions of lentil (*Lens culinaris* Medic.) for salt tolerance at two growth stages. *Plant and Soil*, **128**: 167-176.

Ashraf M., McNeilly T. e Bradshaw A.D. (1986). The potential for evolution of salt (NaCl) tolerance in seven grass species. *The New Phytologist*, **103**: 299-309.

Ashraf M., McNeilly T. e Bradshaw A.D. (1987). Selection and heritability of tolerance to NaCl in four species. *Crop Science*, **27**: 232-234.

Awad A. S., Edwards D.G. e Campbell L.C. (1990). Phosphorus enhancement of salt tolerance of tomato. *Crop Science*, **30** 123-128.

- Bailey C.J. e Boulter D. (1972). The structure of vicilin of *Vicia faba*. *Phytochemistry*, **11**: 59-64.
- Balasubramanian V. e Sinha S.K. (1976). Effect of salt stress on growth, nodulation, and nitrogen fixation in cowpea and mung beans. *Physiologia Plantarum*, **36**: 197-200.
- Ballaster G.F., Cerdá A. e Martínez V. (1997). Role of calcium in short-term responses of bean plants to osmotic shocks. *Journal of Plant Nutrition*, **151**: 714-747.
- Banuls J., Legaz F. e Primo-Millo E. (1991). Salinity-calcium interactions on growth and ionic concentration of Citrus plants. *Plant and Soil*, **133**: 39-46.
- Barkla B.J. e Pantoja O. (1996). Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, **47**: 159-184.
- Barkla B.J., Zingarelli L., Blumwald E. e Smith J.A.C. (1995). Tonoplast Na⁺/K⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiology*, **109**: 549-556.
- Bayomi H.E.A.F., Borbála B. e Kecskés M. (1995). Some environmental factors influencing the survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Acta Biologica Hungarica*, **46**: 17-30.
- Bekki A., Trinchant J.C. e Rigaut J. (1987). Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum*, **71**: 61-67.
- Below F.E. (1995). Nitrogen metabolism and crop productivity. In *Handbook of Plant and Crop Physiology*: 275-301, Pessarakli M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Ben-Hayyim G., Vaadia Y. e Williams B.G. (1989). Protein associated with salt adaptation in citrus and tomato cells: Involvement of 26 kDa polypeptides. *Physiologia Plantarum*, **77**: 332-337.
- Bennete A.C. e Adams F. (1970). NH₃ (aq) required for incipient NH₃ toxicity to seedlings. *Proceedings - Soil Science and Society of America*, **34**: 259-263.
- Bernstein L. e Ogata G. (1966) Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybean and alfalfa. *Agronomy Journal*, **58**: 201-203.
- Bernstein L., Francois L.E. e Clark R.A. (1974). Interactive effects of salinity and fertility on yields of grains and vegetables. *Agronomic Journal*, **66**: 412-421.
- Berridge M.J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Annual Review of Biochemistry*, **56**: 159-193.
- Billard J.P. e Boucaud J. (1980). Effects of NaCl on the activities of glutamate synthase from a halophyte *Suaeda maritima* and from a glycophyte *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, **19**: 1939-1945.
- Bisson M.A. e Gutknecht J. (1980). Osmoregulation in algae. In *Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues*: 131-148. Spanswick R.M., Lucas W.J. e Dainty (eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Blum A. (1985). Breeding crop varieties for stress environments. CRC Critical Review. *Plant Science*, **2**: 199-238.
- Bollini R. e Chrispeels M.J. (1978). Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L.. *Planta*, **142**: 291-298.

- Bonetti A., Miggiano A., Dinelli G. e Lovato A. (1995). Identification of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars grown in Italy by field and electrophoresis tests: a comparative study. *Seed science and Technology*, **23**: 69-84.
- Bordeleau L.M. e Prévost D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, **161**: 115-125.
- Botsford J.L. e Lewis T.A. (1990). Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 488-494.
- Bourgeois-Chaillou P., Alfocca F.P. e Guerrier G. (1992). Comparative effects of N-sources on growth and physiological responses of soyabean exposed to NaCl-stress. *Journal of Experimental Botany*, **43**: 1125-1133.
- Boursier P. e Läuchli A. (1989). Mechanisms of chloride partitioning in leaves of salt-stressed *Sorghum bicolor* L.. *Physiologia Plantarum*, **77**:537-544.
- Bray C.M. (1983). Nitrogen Metabolism in Plants. Logman, New York.
- Bremberger C., Haschke H.P. e Lüttge U. (1988). Separation and purification of the tonoplast ATPase and pyro+hosphatase from plants with constitutive and inducible Crassulacean acid metabolism. *Planta*, **175**: 465-470.
- Bremberger C. e Lüttge U. (1992). Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of crassulacean acid metabolism. *Planta*, **188**: 575-580.
- Brewing N.J., Ambrose M.J. e Downie J.A. (1993). Root nodules, *Rhizobium* and nitrogen fixation. In Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology, Vol. **10**: 237-290, Casey R. e Davies D.R. (eds.). Cab International, Wallingford.
- Cachorro P., Ortiz A. e Cerdá A. (1994). Implications of calcium nutrition on the response of *Phaseolus vulgaris* L. to salinity. *Plant and Soil*, **159**: 205-212.
- Caetano-Anollés G., Lagares ^a e Favelukes G. (1989). Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: dependence on divalent cations and pH. *Plant and Soil*, **117**: 67-74
- Caldwell J.H., Van Brunt J. e Harold F.M. (1986). Calcium-dependent anion channel in the water mold, *Blastocladiella emersonii*. *Journal of Membrane Biology*, **39**: 85-97.
- Carter M.R. (1983). Growth and mineral composition of barley and wheat across sequences of Soloetzic soil. *Plant and Soil*, **74**: 229-235.
- Casey R.R., Domoney C. e Smith A.M. (1993). Biochemistry and Molecular Biology of Seed Products. In Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology: 121-163, Casey R. e Davies D.R. (eds.). Cab International, Wallingford.
- Cerdá A., Caro M. e Fernandez F.G.(1982). Salt tolerance of two pea cultivars. *Agronomy Journal*, **74**: 796-798.
- Chambers S.J., Bacon J.R. e Lambert N. (1992). The quantitative analysis of seed proteins from peas using high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, **3**: 49-54.

Champagnol F. (1979). Relationships between phosphate nutrition of plants and salt toxicity. *Phosphorus in Agriculture*, **76** 35-43.

Chien C.T., Maundu J., Cavaness J. e Dandurand L.M. (1992). Characterization of salt-tolerant and salt-sensitive mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain C1204b. *FEMS Microbiology Letters*, **90**: 135-140.

Chrambach A. e Rodbard D. (1988). "Quantitative" and preparative polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel electrophoresis of Proteins* (8th ed.), Hames B.D. e Rickwood D. (eds.). IRL Press, Oxford.

Colmer T.D., Fan T.W.M., Higashi R.M. e Läuchli A. (1996). Interactive effects of Ca²⁺ and NaCl salinity on the ionic relations and proline accumulation in the root tip of *Sorghum bicolor*. *Physiologia Plantarum*, **97**: 421-424.

Cook R.J. (1995). Gel electrophoresis for the identification of plant varieties. *Journal of Chromatography A*, **698**: 281-299.

Cordovilla M.D., Berrido S.I., Ligerio F. e Lluch C. (1999c). *Rhizobium* strain effects on the growth and nitrogen assimilation in *Pisum sativum* and *Vicia faba* plant growth under salt stress. *Plant Science*; **140**: 127-136.

Cordovilla M.D., Ligerio F. e Lluch C. (1999a). Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *Applied Soil Ecology*; **11**: 1-7.

Cordovilla M.D., Ligerio F. e Lluch C. (1999b). Effects of NaCl on nitrogen fixation and assimilation of inoculated and KNO₃ fertilized of *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L.. *Plant Science*; **140**: 127-136.

Cordovilla M.P., Ligerio F. e Lluch C. (1994). The effect of salinity, N fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*, **279**: 1483-1488.

Cordovilla M.P., Ligerio F. e Lluch C. (1996). Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. *Journal of Experimental Botany*, **47**: 203-210.

Cowan M.C. (1979). The effects of nitrogen source on levels of amino acids in peas. *Plant and Soil*, **51**: 279-282.

Cramer G.R., Läuchli A. e Polito V.S. (1985). Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiology*, **79**: 207-211.

Cramer G.R., Lynch J. Läuchli A. e Epstein E. (1987). Influx of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings. Effects of supplemental Ca²⁺. *Plant Physiology*, **83**: 510-516.

Croy R.R.D., Derbyshire E., Krishna T.G. e Boulter D. (1979). Legumin of *Pisum sativum* and *Vicia faba*. *The New Phytologist*, **83**: 29-35.

Croy R.R.D., Gatehouse A., Tyler M. e Boulter D. (1980). The purification and characterization of a third storage protein (convicilin) from the seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Biochemistry Journal*, **191**: 509-516.

Croy R.R.D., Hoque M.S., Gatehouse A. e Boulter D. (1984). The major albumin proteins from pea (*Pisum sativum* L.). *Biochemistry Journal*, **218**: 795-803.

Davenport R.J., Reid R.J. e Smith F.A. (1997). Sodium-calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. *Physiologia Plantarum*, **99**: 323-327.

Davies D.R. (1993). The pea crop. In *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*: 1-12. Casey R. e Davies D.R. (eds.). Cab International, Wallingford.

- Davies D.R., Berry G.J., Health M.C. e Dawkins T.C.K. (1985). Pea (*Pisum sativum* L.). In Grain legume Crops: 147-198, Summerfield R.J. E Roberts E.H. (eds.). Collins, London.
- Delgado M.J., Ligeró F. e Lluch C. (1993). Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum*, **89**: 824-829.
- Delgado M.J., Ligeró F. e Lluch C. (1994). Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**: 371-376.
- Derbyshire E., Right D.J. e Boulter D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, **15**: 3-24.
- Devitt D., Jarrel W.M. e Stevens K.L. (1981). Sodium-potassium ratios in soil solution and plant response under saline conditions. *Soil Science Society of American Journal*, **45**: 80-86.
- Dinelli G., Bonetti A. (1992^a). Capillary electrophoresis as an identification tool for *Phaseolus vulgaris* L. cultivars. *Seed Science and Technology*, **20**: 241-249.
- Dinelli G., Bonetti A. (1992^b). Capillary electrophoresis in species and cultivar determination. *Seed Science and Technology*, **20**: 561-569.
- Doré T., Meynard J.M. e Sebillotte M. (1998). The role of grain number, nitrogen nutrition and stem number in limiting pea crop (*Pisum sativum*) yields under agricultural conditions. *European Journal of Agronomy*; **8**, 29-37.
- Drew M.C., Guenther J. e Läuchli A. (1988). The combined effects of salinity and root anoxia on growth and net Na⁺ and K⁺ accumulation in *Zea mays* grown in solution culture. *Annals of Botany*, **61**: 41-53.
- Dua R.P., Sharma S.K. e Mishra B. (1989). Response of broad bean (*Vicia faba*) and pea (*Pisum sativum*) varieties to salinity. *Indian Journal of Agriculture and Science*, **59**: 729-731.
- Dubey R.S. (1994). Protein synthesis by plants under stressful conditions. In Handbook of Plant and Crop Stress: 277-299, Pessarakli M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Dubey R.S. e Rani M. (1987). Proteases and proteins in germinating rice seeds in relation to salt tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, **12** 9-15.
- Dubey R.S. e Sharma K.N. (1990). Behaviour of phosphatases in germinating rice in relation to salt tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, **28**: 17-23.
- Dunlop J. e Bowling D.J.F. (1978). Uptake of phosphate by white clover. II. The effect of pH on the electrogenic phosphate pump. *Journal of Experimental Botany*, **29**: 1147-1153.
- Elsheikh E.A.E. (1998). Effects of salt rhizobia and bradyrhizobia: a review. *Annals of Applied Biology*, **132**: 507-524.
- Elsheikh E.A.E. e Wood M. (1990). Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany*, **41** (231): 1263-1269.
- Elsheikh E.A.E. e Wood M. (1995). Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-tolerant bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **27** (4/5): 657-661.
- Feigin A. (1990). Interactive effects of salinity and ammonium/nitrate ratio on growth and chemical composition of melon plants. *Journal of Plant Nutrition*, **13**: 1257-1269
- Feigin A., Rylski I, Meiri A. e Shalhevet J. (1987). Response of melon and tomato plants to chloride-nitrate ratios in saline nutrient solutions. *Journal of Plant Nutrition*, **5**: 1369-1385.

- Figueira E. (1992). Estudo da tolerância salina de *Halimione portulacoides* (L.) Aellen Verh. Trabalho de Síntese de Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Universidade de Aveiro.
- Figueira E. e Caldeira G. (1996). Salinity tolerance of *Pisum sativum* cultivars. *Proceedings of the 9th International Colloquium of the Optimization of Plant Nutrition*. Vol. 1: 477-481. Prague.
- Figueira E. e Caldeira G. (1997). Avaliação dos efeitos do NaCl nas cv. de *Pisum sativum* Resal e Tristar. *Actas de Horticultura*, Vol. 17: 294-299.
- Flowers T.J. (1994). Introduction: world population and agricultural productivity. In *Soil Mineral Stresses – Approaches to Crop Improvement*, Vol.21: 1-9, Yeo A.R. e Flowers T.J. (eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Flowers T.J. e Dalmond D. (1992). Protein synthesis in halophytes- the influence of potassium, sodium and magnesium *in vitro*. *Plant and Soil*, , 146: 153-161.
- Flowers T.J. e Läuchli A. (1978). Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum: The influence of the salinity of the culture solution on the content of various organic compounds. *Annals of Botany*, 42: 1057-1064.
- Flowers T.J. e Yeo A.R. (1986). Ion relations of plants under drought and salinity stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 77-89.
- Flowers T.J. e Yeo A.R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 875-884.
- Flowers T.J., Garcia M., Koyama M. e Yeo A.R. (1997). Breeding for salt tolerance in crop plants -The role of molecular biology. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19 427-433.
- Flowers T.J., Hajibagheri M.A. e Yeo A.R. (1991). Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant, Cell and Environment*, 14: 319-325.
- Flowers T.J., Troke P.F. e Yeo A.R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 28: 89-121.
- Fox T.C. e Guerinot M.L. (1998). Molecular Biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 669-696.
- Foyer C. e Spencer C. (1986). The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves. Effects of intracellular orthophosphate distribution, photosynthesis and assimilate partitioning. *Planta*, 167: 369-375.
- Franco J.A. (1971). Nova Flora de Portugal, Vol 1: 344. Sociedade Astoria, Lisboa
- Francois L.E. e Maas E.V. (1994). Crop response and management on salt-affected soils. In *Handbook of Plant and Crop Stress*: 149-181, Pessarakli M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Fricke W., Leigh R.A. e Tomos A.D. (1996). The intracellular distribution of vacuolar solutes in the epidermis and mesophyll of barley leaves changes in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*, 302: 1413-1426.
- Gale J. e Zeroni M. (1985). The cost to plant of different strategies of adaptation to stress and the alleviation of stress by increasing assimilation. *Plant and Soil*, 89: 57-67.
- Garbarino J. e DuPont F.M. (1988). NaCl induces a Na⁺/K⁺ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiology*, 86: 231-236.
- Georgiev G.I. e Atkins C.A. (1993). Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism, export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis*, 15: 239-255.

- Gerald C.J. (1971). Influence of osmotic potential, temperature, and calcium on growth of plant roots. *Agronomy Journal*, **63**: 555-558.
- Ghassemi F., Jakeman A.J. e Nix H.A. (1995). *Salinization of Land and Water Resources*. CAB International, Wallingford.
- Gibson T.S., Speirs J. e Brady C.J. (1984). Salt tolerance in the plants. II. *In vitro* translocation of m-RNAs from salt tolerant and salt-sensitive plants on wheat germ ribosomes: responses to ions and compatible solutes. *Plant, Cell and Environment*, **7**: 579-87.
- Glenn A.R., Poole P.S. e Hudman J.F. (1980). Succinate uptake by free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, **119**: 267-271.
- Glikey J.C. e Staehelin L.A. (1989). A new organelle related to osmoregulation in ultrarapidly frozen *Pelvetia* embryos. *Planta*, **178**: 425-435.
- Gorham J. (1990). Salt tolerance in Triticeae: K/Na discrimination in synthetic hexaploid wheats. *Journal of Experimental Botany*, **41**: 623-627.
- Gorham J., Forster B.P., Budrewicz E., Wyn Jones R.G., Miller T.E. e Law C.N. (1986). Salt tolerance in the Triticeae: solute accumulation and distribution in a amphidiploid derived from *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring and *Thinopyrum bessarabicum*. *Journal of Experimental Botany*, **37**: 1435-1449.
- Grant D.R., Summer A.K. e Johnson J. (1976). An investigation of pea albumin. *Canadian Institute of Food and Science Technology*, **9**: 84-91.
- Grattan S.R. e Maas E.V. (1984). Interactive effects of salinity and substrate phosphate on soybean. *Agronomy Journal*, **76**: 668-676.
- Grattan S.R. e Maas E.V. (1985). Root control of leaf phosphorus and chloride accumulation in soybean under salinity stress. *Agronomy Journal*, **77**: 890-895.
- Grattan S.R. e Maas E.V. (1988). Effect of salinity on phosphate accumulation and injury in soybean. I. Influence of CaCl₂/NaCl ratios. *Plant and Soil*, **105**: 25-32.
- Grattan S.R. e Grieve C.M. (1994). Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. In *Handbook of Plant and Crop Stress*: 203-226, Pessaraki M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Greenway H. e Munns R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, **31**: 149-190.
- Greenway H. e Osmond C.B. (1972). Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiology*, **49**: 256-259.
- Grierson W. (1995). Role of temperature in the physiology of crop plants: pre- and postharvest. In *Handbook of Plant and Crop Physiology*: 611-683, Pessaraki M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Hajibagheri M.A. e Flowers T.J. (1989). X-ray microanalysis of ion distribution within root cortical cells of the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum. *Planta*, **177**: 131-136.
- Hajibagheri M.A., Harvey D.M.R. e Flowers T.J. (1987). Quantitative ion distribution within root cells salt-sensitive and salt-tolerant maize varieties. *The New Phytologist*, **105**: 367-379.
- Hajibagheri M.A., Yeo A.R., Flowers T.J. e Collins J.C. (1989). Salinity resistance in *Zea mays*: Fluxes of potassium, sodium and chloride, cytoplasmic concentrations and microsomal membrane lipids. *Plant, Cell and Environment*, **12**: 753-757.

- Hall J.L. e Flowers T.J. (1973). The effect of salt on protein synthesis in the halophyte *Suaeda maritima*. *Planta*, **110** 361-369.
- Harvey D.M.R. (1977). Photosynthesis and translocation. In *The Physiology of the Garden Pea*, Vol **12**: 315-348, Sutcliffe J.F. e Pate J.S. (eds.). Academic Press, London.
- Harvey D.M.R., Hall J.L., Flowers T.J. e Kent B. (1981). Quantitative ion localization within *Suaeda maritima* leaf mesophyll cells. *Planta*, **151**: 555-562.
- Hashem F.H. e Kuykendall D. (1994). Plasmid DNA content of several agronomically important *Rhizobium* species that nodulate alfalfa, berseen clover, or *Leucaena*. In *Symbiotic Nitrogen Fixation*: 181-188, Graham P.H., Sadowsky M.J. e Vance C.P. (eds.). Kluwer Academic, Dordrecht.
- Haynes R.J. (1986). Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In *Mineral Nitrogen in the Plant Soil System*: 303-358., Haynes R.J. (ed.). Academic Press, New York.
- Heenan D.P. e Campbell L.C. (1981). Influence of potassium and manganese on growth and uptake of magnesium by soybeans (*Glycine max* (L.) Merr. cv Bragg). *Plant and Soil*, **61**: 447-456.
- Heidrich R. e Schroeder J.I. (1989). The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **40**: 539-569.
- Heidrich R., Schroeder J.I. e Fernandez, J.M. (1986). Patch-clamp studies on higher plant cells: a prespective. *Trends in Biochemical Sciences*, **12**: 49-52.
- Hoffmann R., Tufariello J. e Bisson M. (1989). Effect of divalent cations on Na⁺ permeability of *Chara corallina* and freshwater grown *Chara buckellii*. *Journal of Experimental Botany*, **40**: 875-881.
- Hsiao T.C. e Läuchli A (1986). Role of potassium in plant-water relations. In *Advances in Plant Nutrition*, Vol. **3**: 281-312, Tinker B. e Läuchli A. (eds.). Praeger Scientific, New York.
- Hurkman W.J. e Tanaka C.K. (1987). The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiology*, **83**: 517-524.
- Igbasan F.A., Guenter W., Warkentin T.D. e McAndrew D.W. (2006). Protein quality of peas as influenced by location, nitrogen application and seed inoculation. *Plant Foods for Human Nutrition*, **49**: 93-105.
- Iyengar E.R.R. e Reddy M.P. (1994). Crop response to salt stress: seawater application and prospects. In *Handbook of Plant and Crop Stress*: 183-201, Pessarakli M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Jacoby B. (1994). Mechanisms involved in salt tolerance by plants. In *Handbook of Plant and Crop Stress*: 97-123, Pessarakli M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Janzen H.H. e Chang C. (1987). Cation nutrition of barley as influenced by soil solution composition in a saline soil. *Canadian Journal of Soil Science*, **67**: 619-629.
- Jeschke W.D. (1984). K⁺-Na⁺ exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation, and salt tolerance. In *Salinity Tolerance in Plants*: 37-58, Staples R.C. e Toenniessen G.H. (eds.). John Wiley & Sons, New York.
- Jeschke W.D. e Stelter W. (1976). Measurement of longitudinal ion profiles in single roots of *Hordeum* and *Atriplex* by use of flameless atomic absorption spectroscopy. *Planta*, **128**: 107-112.
- Jeschke W.D., Pate J.S. (1991). Cation and chloride partitioning through xylem and phloem within the whole plant of *Ricinus communis* L. under conditions of salt stress.. *Journal of Experimental Botany*, **42**: 1105-1116.

- Jeschke W.D., Pate J.S. e Atkins C. (1987). Partitioning of K⁺, Na⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺ through xylem and phloem to component organs of nodulated white lupin under mild salinity. *Journal of Plant Physiology*, **128**: 77-93.
- Jordan D.C. (1984). *Rhizobiaceae*. In M. Bergey's Manual of Systematic Bacterology, vol. I: 234-256, Krieg N.R. e Holt J.G. (eds.). The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Joshi S. (1987). Effect of soil salinity on nitrogen metabolism in *Cajanus cajan* L.. *Indian Journal of Plant Physiology*, **30**: 223-231.
- Kakfafi U., Valoras N. e Letley J. (1982). Chloride interaction with nitrate and phosphate nutrition in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Journal of Plant Nutrition*, **5**: 1369-1385.
- Kakshmi-Kumari M., Singh C.S. e Subbarao N.S. (1974). Root hair infection and nodulation in lucerne *Medicago sativa* L. as influenced by salinity and alkalinity. *Plant and Soil*, **40**: 261-268.
- Kaloo G. (1993). Pea (*Pisum sativum* L.). In Genetic Improvement of Vegetable Crops: 409-425. Kaloo G. e Berg B.O. (eds.). Pergamon Press, Oxford.
- Katsuhara M. e Tazawa M. (1986). Salt tolerance in *Nitellopsis obtusa*. *Protoplasma*, **135**: 155-163.
- Katsuhara M. e Tazawa M. (1990). Mechanism of calcium-dependent salt tolerance in cells of *Nitella obtusa*: Role of intracellular adenine nucleotides. *Plant, Cell and Environment*, **13**: 179-183.
- Katz A., Kaback H.R. e Avron M. (1986). Na⁺/H⁺ antiport in isolated plasma membrane vesicles from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *FEBS Letters*, **202**: 141-144.
- Kauss H. (1987). Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, **38**: 47-72.
- Kirkby E.A. e Mengel K. (1967). Ionic balance in different tissues of the tomato plants in relation to nitrate, urea, or ammonium nutrition. *Plant Physiology*, **42**: 6-14.
- Klobus G., Ward M.R. e Huffaker R.C. (1988). Characteristics of injury and recovery of net NO₃⁻ transport of barley seedlings from treatments of NaCl. *Plant Physiology*, **87**: 878-882.
- Kumar H., Arora N.K., Kumar V. e Maheshwari D.K. (1999). Isolation, characterization and selection of salt tolerant rhizobia nodulating *Acacia catechu* and *A. nilotica*. *Symbiosis*, **26**: 279-288.
- Kurvits A. e Mengel E.A. (1980). The uptake of nutrients by sunflower plants (*Helianthus annuus*) growing in a continuous flowing culture system, supplied with nitrate or ammonium as nitrogen source. *Zeitschrift Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **143** 140-149.
- Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R. e Coruzzi G.M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen into amino acids in higher plants. *Annual Review of plant Physiology and Molecular Biochemistry*, **47**: 569-593.
- Läuchli A. (1984). Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. In Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement: 171-187. Staples R. e Toenniessen G.H. (eds.). John Wiley, New York
- Läuchli A. (1990). Calcium salinity and the plasma membrane. In Calcium in the Plant Growth and Development: 26-35. Leonard R.T. e Hepler P.K. (eds.). American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Läuchli A. e Wieneke J. (1979). Studies on growth and distribution of Na⁺, K⁺ e Cl⁻ in soybean varieties differing in salt tolerance. *Zeitschrift Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **142** 3-13.

- Lauter D.J. e Munns D.N. (1986). Salt resistance of chickpea genotypes in solutions salinized with NaCl and Na₂SO₄, *Plant and Soil*, **95**: 271-279.
- Lauter D.J., Munns D.N. e Clarkin K.L. (1981). Salt response of chickpea as influenced by N supply. *Agronomy Journal*, **73**: 961-266.
- Leidi E.O. e Lips S.H. (1990). Effect of NaCl salinity on photosynthesis, ¹⁴C-translocation and yield in wheat plants irrigated with ammonium or nitrate solutions, *Irrigation Science*, **11**:155-161.
- Leidi E.O., Silberbush M. e Lips S.H. (1991). Wheat growth as affected by nitrogen type, pH and salinity. I. Biomass production and mineral composition. *Journal of Plant Nutrition*, **14**: 235-246.
- Leidi E.O., Silberbush M., Soares M.I.M. e Lips S.H. (1992). Salinity and nitrogen nutrition studies on peanut and cotton plants. *Journal of Plant Nutrition*, **15**: 591-604..
- Leigh R.A. e Wyn Jones R.G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentration for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *The New Phytologist*, **97**: 1-13.
- Leigh R.A. e Wyn Jones R.G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *The New Phytologist*, **97**: 1-13.
- Levitt J. (1980). Responses of plants to Environmental Stresses, Vol. II. Academic Press, New York.
- Lewis O.A.M., Leidi E.O. e Lips S.H. (1989). Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat, *The New Phytologist*, **111**:155-160.
- Lovell P.H. (1977). Correlative influences in seedling growth. In *The Physiology of the Garden Pea*: 265-290, Sutcliffe J.F. e Pate J.S. (eds.). Academic Press, London.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. e Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- Lynch J. e Läuchli A. (1985). Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L.). *The New Phytologist*, **99**: 345-354.
- Maas E.V. e Grieve C.M (1987). Sodium-induced calcium deficiency in salt-stressed corn. *Plant, Cell and Environment*, **63**: 559-564.
- Maas E.V. e Hoffman G.J. (1977). Crop salt tolerance – current assessment. *American Society of Civil Engineer*, **103**: 115-134.
- Maathuis F.J.M. e Prins H.B.A. (1991). Patch-clump studies in cell membranes of higher plants. *Acta Botanica Neerlandica*, **40**: 197-204.
- Magalhães J.R. e Huber D.M. (1989). Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. *Fertility Research*, **21**: 1-6.
- Maltese S., Atta S. e Cousin R. (1995). Determination of pea seed composition by near infrared transmission spectroscopy. *Proceedings of the 2nd European Conference on Grain Legumes*: 372-373. Copenhagen.
- Marschner H. (1995). Mineral Nutrition of higher Plants (2^a ed.). Academic Press, London.
- Martínez V. e Cerdá A. (1989). Influence of N source on rate of Cl⁻, N, Na⁺, and K⁺ uptake by cucumber seedlings grown in saline conditions. *Journal of Plant Nutrition*, **12**: 971-983.
- Martinola E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K. e Amrhein N. (1993). ATP-dependnet glutathione S-conjugate “export” pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, **364** 247-249.

- Marx G.A. (1977). Classification, genetics and Breeding. *In* The Physiology of the Garden Pea: 21-43, Sutcliffe J.F. e Pate J.S. (eds.). Academic Press, London.
- Matsumoto H. e Chung G.C. (1988). Increase in proton-transport activity of vesicles as an adaptive response of barley roots to NaCl stress. *Plant and Cell Physiology*, **29**: 1133-1140.
- Matsushita N. e Matoh T. (1991). Characterization of Na⁺ exclusion mechanisms of salt-tolerant reed plants in comparison with salt-sensitive rice plants. *Physiologia Plantarum*, **83**: 170-176.
- Matta N.K., Gatehouse J.A. e Boulter D. (1981). Molecular and subunit heterogeneity of legumin of *Pisum sativum* L. (garden pea) – A multiple dimensional gel electrophoretic study. *Journal of Experimental Botany*, **32**: 1295-1307.
- Matthews P. e Arthur E. (1985). Genetic and environmental components of variation in protein content of peas. *In* The Pea Crop: 369-381, Hebblethwaite P.D., Health M.C. e Dawkins T.C.K. (eds.). Butterworths, London.
- McKay I.A., Dilworth M.J. e Glenn A.R. (1988). C₄-dicarboxylate metabolism in free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *Journal of General Microbiology*, **134**: 1433-1440.
- Melchor-Marroquin J.I., Vargas-Hernandez J.J., Ferrera-Cerrato R. e Krishnamurthy L. (1999). Screening *Rhizobium* spp. Strains associated with *Gliricidia sepium* along an altitudinal transect in Veracruz, Mexico. *Agroforestry Systems*, **46**: 25-38.
- Mennen H., Jacoby B. e Marschner H. (1990). Is sodium proton antiport ubiquitous in plants cells?. *Journal of Plant Physiology*, **137**: 180-183.
- Mimura T., Dietz K.J., Kaiser W., Schramm M.J.M Kaiser G. e Heber U. (1990). Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta*, **180**: 139-146.
- Mittal R. e Dubey R.S. (1991). Behaviour of peroxidases in rice: Changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, **29**: 31-37.
- Moëne-Loccoz Y. e Weaver R.W. (1995). Involvement of plasmids in saprophytic performance and sodium chloride tolerance of clover rhizobia W14-2 *in vitro*. *Applied Soil Ecology*, **3**: 137-148.
- Mohammad R.M., Akhavan-Kharazian M., Campbell W.F. e Rumbaugh M.D. (1991). Identification of salt- and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and Soil*, **74**: 72-76.
- Mohammad R.M., Campbell W.F. e Rumbaugh M.D. (1989^a). Variation in salt tolerance of alfalfa. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, **3**: 11-20.
- Mohammad R.M., Campbell W.F. e Rumbaugh M.D. (1989^b). Acetylene reduction activity in salt-tolerant alfalfa and *Rhizobium*. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, **3**: 469-476.
- Mohammad R.M., Campbell W.F. e Rumbaugh M.D. (1989^c). Acetylene Reduction Activity in Salt-Tolerant Alfalfa/*Rhizobium* under Drought Stress. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, **3**: 431-438.
- Murray D.R. (1979). A storage role for albumins in pea cotyledons. *Plant, Cell and Environment*, **2**: 223-226.
- Murray D.R. e Vairinhos F. (1982). Albumin from pea seeds are distinct from vicilin. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **106**: 465-468.
- Nakamura Y., Kasamo K., Shimosato N., Sakata M. e Ohta E (1992). Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca²⁺ ions. *Plant and Cell Physiology*, **33**: 139-149.

- Nakamura T., Osaki M., Ando M. e Tadano T. (1996). Differences in mechanisms of salt tolerance between rice and barley plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, **42**: 303-314.
- Nakamura Y., Tanaka K., Ohta E. e Sakata M. (1991). Protective effect of external Ca^{2+} on elongation and the intracellular concentration of K^{+} in intact mung bean roots under high NaCl stress. *Plant, Cell and Environment*, **31**: 815-821.
- Noble C.L., Halloran G.M. e West D.W. (1984). Identification and selection for salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, **35**: 239-252.
- Nunes M.A., Dias M.A., Correia M. e Oliveira M.M. (1984). Further studies on growth and osmoregulation of sugar beet leaves under low salinity conditions. *Journal of Experimental Botany*, **35**: 322-331.
- Oertli J.J. (1968). Extracellular salt accumulation, a possible mechanism of salt injury in plants. *Agrochimica*, **12**:461-469.
- Okusanya O.T. e Ungar I.A. (1984). The growth and mineral composition of three species of *Spergularia* as affected by salinity and nutrients at high salinity. *American Journal of Botany*, **71**: 439-447.
- Parker M.B., Gaines T.P., Hook J.E., Gascho G.J. e Maw B.W. (1987). Chloride and water stress effects on soybean in pot culture. *Journal of Plant Nutrition*, **10**: 517-538.
- Pasqualini S., Lluch C. e Antonielli M. (1991). Seed Storage proteins in several genetic lines of *Vicia faba*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **29**: 507-515.
- Pasternak D., Twersky D. e DeMallach Y. (1979). Salt resistance in crops. In *Stress Physiology in Crop Plants*: 127-142, Mussel H. e Staples R.C. (eds). John Wiley and Sons, New York.
- Pate J.S. e Flinn A.M. (1977). Fruit and seed development. In *The Physiology of the Garden Pea*: 431-468. Sutcliffe J.F. e Pate J.S. (eds.). Academic Press, London.
- Pessaraki M. (1994). Response of green beans (*Phaseolus vulgaris*) to salt stress. In *Handbook of Plant and Crop Stress*: 415-430, Pessaraki M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Pessaraki M. e Zhou M. (1990). Effect of salt tolerance on nitrogen fixation by different cultivars of greenbeans. *Journal of Plant Nutrition*, **13**: 611-629.
- Phillips D.A. (1980). Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annual Review of Plant Physiology*, **31**: 29-49.
- Phillips D.A. (1991). Genetic enhancement of nitrogen fixation. In *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*: 408-428, Dilworth M.J. e Glenn A.R. (eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Piceno Y.M. e Lovell C.R. (2000). Stability in natural bacterial communities: II. Plant resource allocation effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecology*, **39**: 41-48.
- Poljakoff-Mayber A. e Lerner H.R. (1994). Plants in saline environments. In *Handbook of Plant and Crop Stress*: 65-96, Pessaraki M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Pope A.J. e Leigh R.A. (1987). Some characteristics of anion transport at the tonoplast of oat roots, determined from the effects of anions on pyrophosphate-dependent proton transport. *Planta*, **172**: 91-100.
- Rabe E. (1990). The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds: *Journal of Horticultural Science*, **65**(3): 231-243.

- Rabe E. (1994). Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. In Handbook of Plant and Crop Stress: 261-276, Pessaraki M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Rai R. (1983). The salt tolerance of *Rhizobium* strains and lentil genotypes and the effect of salinity on aspects of symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Agricultural Science*, **100**: 81-86.
- Rai R. e Singh R.P. (1999). Effect of salt stress on interaction between lentil (*Lens culinaris*) genotypes and *Rhizobium* spp. strains symbiotic N₂ fixation in normal and sodic soils. *Biology and Fertility of Soils*, **29**: 187-195.
- Ramagopal S. (1986). Protein synthesis in maize callus exposed to NaCl and mannitol. *Plant Cell Reports*, **5**: 430-436.
- Rao K.P. e Rains D.W. (1976). Nitrate absorption by barley. *Plant Physiology*, **57**: 55-58.
- Ratajczak R., Richter J. e Lüttge U. (1994). Adaptation of the tonoplast V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* to salt stress, C₃-CAM transition and plant age. *Plant, Cell and Environment*, **17**: 1101-1112.
- Rathert G. (1982) Influence of extreme K:Na ratios and high substrate salinity on plant metabolism of crops differing in salt tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, **5**: 183-193.
- Ratner A. e Jacoby B. (1976). Effect of K⁺, its counter anion, and pH on sodium efflux from barley root tips. *Journal of Experimental Botany*, **27**: 843-848.
- Reuveni M., Bennett A.B., Bressan R.A. e Hasegawa P.M. (1990). Enhanced H⁺ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H⁺-ATPase after NaCl adaptation. *Plant physiology*, **94**: 524-530.
- Robson A.D. e Bottomley P.J. (1991). Limitations in the use of legumes in agriculture and forestry. In Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation: 320-349. Dilworth M.J. e Glenn A.R. (eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Robson A.D. e Pitman M.G. (1983). Interactions between nutrients in higher plants. In Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. **15A**: 147-180, Läuchli A. e Bielecki R.L. (eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Rockel B., Ratajczak R., Becker A. e Lüttge U. (1994). Changed particle and diameters of intra-membrane tonoplast particles of *Mesembryanthemum crystallinum* in correlation with NaCl-induced salt stress. *Journal of Plant Physiology*, **143**: 318-324.
- Rogers M.E., Noble C.L., Halloran G.M. e Nicolas M.E. (1997). Selecting for salt tolerance in white clover (*Trifolium repens*): chloride ion exclusion and its heritability. *The New Phytologist*, **135**: 645-654.
- Ronson C.W., Lytleton P. e Robertson J.G. (1981). C₄-dicarboxylate transport mutants in *Rhizobium trifolii* from ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **78**: 4284-4288.
- Ruffy T.W. jr, Raper C.D. e Jackson W.A. (1982). Nitrate uptake, root and shoot growth, ion balance of soybean plants during acclimatation to root-zone acidity. *Botanical Gazette (Chicago)*, **143**: 5-17.
- Saxena N.P., Johansen C., Saxena M.C. e Silim S.N. (1993). Selection for drought and salinity resistance in cool season food legumes. In Breeding for Stress Tolerance in Cool-Season Food Legumes. Singh K.B. e Saxena M.C. (eds.). John Wiley, New York.
- Schachtman D.P., Tyerman S.D. e Terry B.R. (1991). The K⁺/Na⁺ selectivity of a cation channel in the plasma membrane of root cells does not differ in salt-tolerant and salt-sensitive wheat species. *Plant Physiology*, **97**: 598-605.

- Schmidt C., He T. e Cramer G.R. (1993). Supplemental calcium does not improve growth of salt stressed Brassicas. *In Plant Nutrition – from Genetics Engineering to Field Practice*: 617-620, Barow N.J. (ed.). Kluwer Academic, Dordrecht.
- Schroeder H.E. (1984). Major albumins of *Pisum* cotyledons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **35**: 191-198.
- Schwenke K.D., Zirwer D., Gast K., Görnitz E., Linow k.J. e Gueguen J. (1990). Changes of the oligomeric structure of legumin from pea (*Pisum sativum* L.) after succinilation. *European Journal of Biochemistry*, **194**: 621-627.
- Serraj R., Roy G. e e Drevon J.J. (1994). Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxigen difusion. *Physiologia Plantarum*, **91**: 161-168.
- Silberbush M. e Lips S.H. (1991). Potassium, Nitrogen, ammonium/nitrate ratio, and sodium chloride effects on wheat growth. I. Shoot and root growth and mineral composition. *Journal of Plant Nutrition*, **14**: 751-764.
- Singh N.K., Bracker C.A., Hasegawa P.M., Kanda A.K., Buckel S., Hermodson M.A., Pfankoch E., Regnier F.E. e Bressan R.A. (1987). Characterization of osmotin, a thumatins-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiology*, **85**: 529-534.
- Singleton P.W. e Bholool B.B. (1983). Effect of salinity on functional components of the soy-bean-*Rhizobium japonicum* symbiosis. *Crop Science*. **23**: 451-460
- Singleton P.W. e Bohlool B.B. (1984). Effect of salinity on the nodule formation by soybean. *Plant Physiology*, **74**: 72-76.
- Singleton P.W., El-Swaify S.A. e Bohlool B.B. (1982). Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**: 884-890.
- Smart D.R. e Bloom A.J. (1998). Investigations of ion absorption during NH_4^+ exposure. I. Relationship between H^+ efflux and NO_3^- absorption. *Journal of Experimental Botany*, **49**: 95-100.
- Smart J. (1990). Grain Legumes, Evolution and Genetic Resources. Cambridge University Press, Cambridge.
- Smith S.E. (1994). Salinity and the production of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *In Handbook of Plant and Crop Stress*: 431-448, Pessarakli M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Solomon M., Ariel R., Mayer A.M e Poljakoff-Mayber A. (1989). Reversal by calcium of salinity-induced growth inhibition in excised pea roots. *Israel Journal of Botany*, **38**: 65-69.
- Somasegaran P. e Hoben H.J. (1994). Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.
- Soussi M., Lluch C. e Ocaña A. (1999). Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chick-pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 1701-1708.
- Soussi M., Ocaña A. e Lluch C. (1998). Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany*, **49**: 1329-1337.
- Sprent J.I. e Zharan H.H. (1988). Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity. *In Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture*: 145-151., Beck D.P. e Materon L.A. (eds.). Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- Sprent J.I., Stephens J.H. e Rupela O.P. (1998). Environmental effects on nitrogen fixation. *In World Crops: Cool Season Food Legumes*: 801-810, Summerfield (ed.). Kluwer Academic, Dordrecht.

- Steinborn J. e Roughley R.J. (1974). Sodium chloride as a cause of low numbers of *Rhizobium* in legume inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, **37**: 93-99.
- Streeter J.G. (1985). Carbon metabolism in legume nodules. In Nitrogen Fixation Research Progress:277-291, Evans H.J., Bottomley P.J. e Newton W.E. (eds.). Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- Suarez D.L. e Grieve C.M. (1988) Predicting cation ratios in corn from saline solution composition. *Journal of Experimental Botany*, **39**: 605-612.
- Subbarao G.V., e Johansen C. (1994). Strategies and scope for improving salinity tolerance in crop plants. In Handbook of Plant and Crop Stress: 559-579, Pessaraki M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Subbarao G.V., Johansen C., Jana M.K. e Kumar Rao J.F.D.K. (1990). Effects of sodium/calcium ratio in modifying salinity response of pigeonpea (*Cajanus cajan*), *Journal of Plant Physiology*, **136**: 439-443.
- Subbarao G.V., Johansen C., Jana M.K. e Kumar Rao J.V.D.K. (1991). Comparative salinity responses among pigeonpea genotypes and their wild relatives. *Crop Science*, **31**: 415-418.
- Sussman M.R. (1994). Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**: 539-569.
- Szabolcs I. (1994). Soils and Salinization. In Handbook of Plant and Crop Stress: 3-11, Pessaraki M. (ed.). Marcel Dekker, New York.
- Szabolcs I. (1992). Salinization of soils and water and its relation to desertification. *Desertification Control Bulletin*, **21**: 32-37.
- Tanner W. e Caspari T. (1996). Membrane transport carriers. *Annual Review of plant Physiology and plant Molecular Biology*, **47**: 595-626.
- Tester M. (1990). Plant ion channels: Whole-cell and single channel studies. *The New Phytologist*, **114**: 305-340.
- Thomson J.A., Schroeder H.E. e Dudman W.F.(1978). Cotyledonary storage proteins in *Pisum sativum*. I. Molecular heterogeneity. *Australian Journal of Plant Physiology*, **5**: 263-279.
- Tu J.C. (1981). Effect of salinity on *Rhizobium*-root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Canadian Journal of Plant Science*, **61**: 231-239.
- Tucci M., Capparelli R. Costa A. e Rao R. (1991). Molecular heterogeneity and genetics of *Vicia faba* seed storage proteins. *Theoretical and Applied Genetics*, **81**: 50-58.
- Tyerman S.D. (1992). Anion channels in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: 351-373.
- Tyerman S.D. e Findlay G.P. (1989). Current-voltage curves of single Cl⁻ channels which coexist with two types of K⁺ channel in the tonoplast of *Chara corallina*. *Journal of Experimental Botany*, **40**: 105-117.
- Tyerman S.D., Skerrett M., Garrill A., Findlay G.P. e Leigh R.A. (1997). Pathways for the permeation of Na⁺ and Cl⁻ into protoplasts derived from the cortex of wheat roots. *Journal of Experimental Botany*, **48**: 459-480.
- Ulrich W.A., Larsson M., Larsson C.M., Lesch S. e Novacky A. (1984). Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes and inhibition of anion uptake. *Physiologia Plantarum*, **61**: 369-374.

Vance C.P. e Gantt J.S. (1992). Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Plant Physiology*, **85**: 266-274.

Vance C.P. e Heichel G.H. (1991). Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**: 373-392.

Velagaleti R.R. e Cline G.R. (1995). Biological nitrogen fixation in legumes and nitrogen transfer in crop plants. In *Handbook of Plant and Crop Physiology*: 303-335, Pessaraki M. (ed.). Marcel Dekker, New York.

Velagaleti R.R., Marsh S., Kramer D., Fleishman D. e Corbin J. (1990). Genotypic variation in growth and nitrogen fixation among soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars grown under salt stress. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, **67**: 169-177.

Velagaleti R.R. e Schweitzer S.M. (1994). General effects of salt stress on growth and symbiotic nitrogen fixation in soybean. In *Handbook of Plant and Crop Stress*: 461-471, Pessaraki M. (ed.). Marcel Dekker, New York.

Wagenet R.J., Rodriguez R.R., Campbell W.F. e Turner D.L. (1983). Fertilizer and salty water effects on *Phaseolus*. *Agronomy Journal*, **75**: 161-166.

Wahab A.M.A. e Zahran H.H. (1981). Effects of salt stress in the nitrogenase activity and growth of four legumes. *Physiologia Plantarum*, **23**: 16-23.

Wang T.L. e Hedley C.L. (1993). Genetic and development analysis of the seed. In *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*: 83-120. Cab International, Wallingford.

Ward J.M. (1997). Patch-Clamping and other molecular approaches for the study of plasma membrane transporters demystified. *Plant Physiology*, **114**: 1151-1159.

Ward M.R., Aslam M. e Huffaker R.C. (1986). Enhancement of nitrate uptake and growth of barley seedlings by calcium under saline conditions. *Plant Physiology*, **80**: 520-524.

Weber L.A., Hickey E.D. Maroney P.A. e Baglioni C. (1977). Inhibition of protein synthesis by Cl⁻. *Journal of Biological Chemistry*, **252**: 407-410.

Wyn Jones R.G. (1981). Salt tolerance. In *Physiological Processes Limiting Plant Productivity*: 271-292, Johnson C.B. (ed.). Butterworth, London.

Wyn Jones R.G., Gorham J. e McDonnell E. (1984). Organic and inorganic solute contents as selection criteria for salt tolerance in the Triticeae. In *Salinity Tolerance in Plants*: 189-203, Staples R.C., Toenniessen G.H. (eds.). John Wiley and Sons, New York.

Yap S.F., Lim S.T. (1983). Response of *Rhizobium* sp. UMKL 20 to sodium chloride stress. *Archives of Microbiology*, **135**: 224-228.

Yazaki Y., Asukagawa N., Ishikawa Y., Ohta E. e Sakata M. (1988). Estimation of cytoplasmic free Mg²⁺ levels and phosphorylation potentials in mung bean root tips *in vivo* ³¹P NMR spectroscopy. *Plant and Cell Physiology*, **29**: 919-924.

Yeo A.R. (1994). Physiological criteria in screening and breeding. In *Soil Mineral Stresses – Approaches to Crop Improvement*, Vol. **21**: 37-59, Yeo A.R. e Flowers T.J. (eds.). Springer-Verlag, Berlin.

Yeo A.R. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Biology*, **49**: 915-926.

Yeo A.R., Yeo M.E. e Flowers T.J. (1988). Selection of lines with high and low sodium transport within varieties of an inbreeding species; rice (*Oriza sativa* L.). *The New Phytologist*, **110**: 13-19.

- Yeo M.E., Cuartero J., Flowers T.J. e Yeo A.R. (1997). Gas exchange, water loss and biomass production in rice and wild *Oryza* species in well-watered and water-limiting growth conditions. *Botanica Acta*, N110N: 32-42.
- Yousef A.N. e Sprent J.I. (1983). Effect of NaCl on growth , nitrogen incorporation in chemical composition of inoculated and NH_4NO_3 fertilized *Vicia faba* L. plants. *Journal of Experimental Botany*, **34**: 941-950.
- Zahran H.H. (1991). Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, **12**: 73-80.
- Zahran H.H. e Sprent J.I. (1986). Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta*, **167**: 303-309.
- Zharan H.H; Rasänen L.A., Karisto M. e Lindstrom K. (1994). Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of Rhizobia by osmotic and heat stress. *Plant and Soil*, **134**: 271-276.
- Zingarelli L., Anzani P. e Lado P. (1994). Enhanced K^+ -stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cells of *Acer pseudoplatanus*. *Physiologia Plantarum*, **91**: 510-516.

Adenda I

Tolerância salina de *Rhizobium*: Tabelas de valores

Nesta adenda, encontram-se tabelados (AI-1 a AI-6) os valores utilizados na elaboração dos gráficos III-1 a III-6, expressos no capítulo III.

Tabela AI-1: Crescimento de isolados (10^7 células mL⁻¹) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola em S. Bernardo. Os valores são médias de 3 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)				
	0	25	50	100	300
SB1	88,58	60,22	28,3	14,16	12,54
SB2	89,41	59	24,75	11,3	10,53
SB3	88,07	71,81	36,89	6,87	8,76
SB4	81,66	87,11	37,41	11,42	8,93
SB5	77,25	61,6	44,46	12,71	10,43
SB6	81,74	16,64	19,92	11,88	7,09
SB7	86,02	72,69	24,51	14,5	10,83
SB8	85,54	18,69	15,16	9,32	7,99
SB9	85,52	45,38	31,81	10,51	10,3
SB10	77,02	48,26	17,15	8,12	7,01
SB11	38,56	12,79	11,3	5,34	7,18
SB12	82,94	66,76	14,47	7,69	7,91
SB13	84,47	68,47	17,44	6,18	11,37
SB14	81,09	36,4	21,76	6,1	7,85
SB15	82,2	73,12	20,64	7,78	9,32
SB16	87,35	57,75	23,81	14,85	9,62

Tabela A1-2: Crescimento de isolados (10^7 células mL^{-1}) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola em Vagos. Os valores são médias de 3 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)						
	0	15	30	60	90	120	180
V1	38,3	14,43	9,77	10,03	8,89	7,26	4,28
V2	45,52	18,33	12,34	13,72	12,16	9,78	5,69
V3	34,34	13,83	8,22	7,35	5,2	3,04	1,87
V4	46,65	22,01	10,48	8,18	9,22	6,54	3,33
V5	54,12	11,98	7,38	6,22	5,06	4,06	2,36
V6	51,91	7,61	1,013	6,74	6,05	4,85	2,81
V7	50,28	18,79	1,35	7,87	6,65	4,53	2,2
V8	44,98		9,76	5,53			
V9	59,06	12,46	10,55	11,05			
V10	50,35	4,65	3,04				
V11	54	6,17	3,04				
V12	45,77	8,46	4,54				
V13	57,6	27,18	6,34				
V14	63,92	7,81	4,2				
V15	33,46	3,7	3,46				
V16	31,7	6,96	1,98				
V17	54,16	11,35	5,1	9,28			
V18	58,02	7,31	4,65	5,97			
V19	50,54		9,55	3,61			
V20	41,1	8,35	3,78	6,78			
V21	48,98	3,72	3,15	5,88		3,11	
V22	41,12			4,13	5,66	3,28	4,97
V23	50,81	5,01	6,72	4,79			
V24	52,58	6,26	4,63	4,09			
V25	51,87	5,1	5,53	6,74			
V26	50,23	25,36	8,05				
V27	42,39	9,41	4,7				
V28	45,68	8,29	4,99				
V29	46,69	17,48	3,54				
V30	55,35	6,13	5,25	5,41			
V31	44,58	6,19	6,25				

Tabela AI-3: Crescimento de isolados (10^7 células mL^{-1}) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola na Costa Nova. Os valores são médias de 3 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)				
	0	25	50	100	300
CN1	30,15	10,4	8,16	3,36	
CN2	37,51	12,32	9,18	1,61	
CN3	46,37	20,23	6,82	4,49	
CN4	44,49	15,39	7,2	4,67	
CN5	49,91	13,91	6,13	3,9	
CN6	61,57	41,98	18,1	8,85	
CN7	52,76	42,75	12,14	13,3	
CN8	63,94	32,19	12,37	10,05	6,11
CN9	56,75	41,32	8,21	8,93	0,63
CN10	38,16	11,53	5,07	4,32	
CN11	35,18	21,44	6,76	6,28	2,12
CN12	40,33	9,92	4,83	1,03	
CN13	48,35	26,74	3,52	1,11	
CN14	37,7	10,77	3,75	1,3	
CN15	60,07	54,75	16,06	4,62	
CN16	68,86	36,25	35,72	11,3	
CN17	59,8	32,66	10,63	7,95	
CN18	16,56	10,08	19,15	12,15	
CN19	52,87	21,35	9,47	4,33	1,42
CN20	49,94	49,42	10,26	2,24	2,67
CN21	47,43	16,39	9,2	2,83	1,15
CN22	58,49	44,81	5,69	4,45	0,82

Tabela AI-4: Crescimento de isolados (10^7 células mL^{-1}) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola em Elvas. Isolamento efectuado em 1997. Os valores são médias de 3-7 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)													
	0	2.5	50	75	100	300	400	500	600	700	800	900	1000	
NI-1	25,93	25,05	32,09	32,83	37,42	40,93	42,58	6,41	8,55	8,07	7,60	7,12	3,22	
NI-2	23,85	25,33	30,09	30,44	33,66	41,64	39,63	4,69	5,58	5,04	4,51	3,97	2,79	
NI-3	27,86	23,91	27,79	25,48	27,93	46,94	38,01	4,62	7,61	7,16	6,72	6,27	3,33	
NI-1	74,16	74,46	24,94	10,63	8,78	3,33								
NI-2	118,00	128,71	113,54	115,18	115,41	4,27								
NI-3	61,11	53,56	36,70	8,87	7,84	3,25								
NI-4	48,64	24,76	31,68	11,08	7,32	2,20								
NI-5	45,15	9,15	7,48	4,12	2,90	0,81								
NI-6	33,40	16,21	1,10	3,99	2,20	1,17								
NI-7	64,50	65,82	49,75	18,27	13,78	6,27								
NI-8	68,74	62,30	47,03	11,51	10,54	2,41								
NI-9	57,29	27,36	12,49	11,34	8,12	3,33								
NI-10	74,35	43,49	37,36	13,89	10,97	1,70								
NI-11	60,92	45,55	36,46	8,32	7,07	2,33								
SI-1	47,03	23,02	34,06	5,58	2,80	3,76								
SI-2	52,55	42,07	15,98	7,09	6,35	0,45								
SI-3	52,93	34,91	33,40	7,15	4,36	1,62								
SI-1	36,15	15,25	10,34	6,75	8,02	1,17								
SI-2	48,17	9,92	11,08	5,66	6,61	0,98								
SI-3	47,07	37,02	28,67	10,51	7,55	1,34								
SI-4	72,91	66,53	50,19	11,20	8,75	3,50								
SI-1	50,38	50,45	62,31	62,11	74,66	50,05								
SI-2	44,11	62,77	62,25	62,65	70,24	51,79								
SI-1	70,82	61,83	10,94	11,33	8,85	1,97								
SI-2	77,12	61,17	16,36	11,31	7,46	2,31								
SI-3	56,58	32,43	8,81	7,14	7,14	1,97								
SI-4	46,15	40,12	8,80	4,69	2,61	2,48								
SI-5	57,86	34,37	9,23	8,80	7,82	1,71								
SI-6	47,78	34,09	11,34	7,01	6,33									
SI-7	89,67	109,10	120,40	130,10	120,80	97,34								
SI-8	65,81	48,61	11,08	9,64	8,89	21,56				1,88				
SI-9	52,26	30,75	10,13	5,47	4,63	2,22								
SI-10	44,95	23,31	8,62	5,54	4,57	5,64								
SI-11	52,08	36,54	14,95	5,63	4,17	6,18								
SI-12	51,41	19,60	10,98	8,80	6,18	8,39								
SI-13	42,28	21,83	9,23	5,29	2,50	5,33								
SI-14	47,46	28,06	10,91	5,50	4,16									

Tabela A1-5: Crescimento de estirpes (10^7 células mL^{-1}) de *Rhizobium leguminosarum* biovar *vezeae* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram enviados pelo USDA e pela Universidade de Granada. Os valores são médias de 6-8 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)																							
	0	15	30	45	60	90	135	180	225	270	300	350	450	600	700	800	900	1000	1200	1400	1600			
GRA19	58,45	20,66	6,92	6,36	5,79	4,97																		
USDA2455	49,58	44,14	18,92	10,66	6,23	3,72																		
USDA2335	52,72	56,7	45,73	18,24	15,74	8,73																		
USDA2370	50,07	51,68	31,75	12,68	8,31	7,67																		
USDA2475	56,96	47,56	39,97	14,67	12,63	7,21																		
USDA2343	30,92	31,18	33,04	33,38	33,71	26,37	12,9	8,84	6,83															
USDA2353	26,64	18,6	18,89	20,2	21,5	24,53	28,57	33,1	31,33	33,76	33,97	40,23	50,18	52,25	52,25	37,6	39,05	14,45	3,85	1,94				2,85
USDA2356	32,12	25,24	20,6	23,69	26,78	28,49	34,89	37,04	36,29	36,37	38,43	41,3	39,18	40,34	20,5	15,24	8,37	2,45	3,28	3,05				
USDA2433	27,32	20,43	19,18	19,18	19,18	20,82	28,2	25,33	29,85	31,59	30,57	38,14	48,11	50,01	43,46	38,61	13,03	3,72	3,81	2,36				
USDA2479	38,55	34,43	26,98	26,14	25,3	34,23	42,61	35,39	38,55	38,98	45,71	49,97	48,9	38,71	24,62	18,96	2,85	2,85	3,05	3,94				

Tabela AI-6: Crescimento de isolados (10^7 células mL⁻¹) de *Rhizobium* em YMB, suplementado com diferentes concentrações de NaCl. Os isolados foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Pisum sativum* L. a crescer num solo agrícola em Elvas. Isolamento efectuado em 1997. Os valores são médias de 3-7 réplicas.

Isolado	NaCl (mM)																				
	0	40	80	115	170	225	280	335	390	500	600	700	800	900	1000	1200	1400	1600	1800		
E20-4	89,58	5,75																			
E20-1	152,3	135,2	146,08	144,86	137,68	121,38	16,03	12,21	15,68	7,11	4,28	4,13									
E20-2	140,09	143,04	141,65	141,48	139,56	93,05	13,08	16,21	11,22	6,31	6,86	5,45									
E20-3	140,9	141,19	136,99	137,16	138,43	86,2	15	14,99	10,53	6,14	6,02	4,93									
E20-5	147,92	153,06	145,04	142,61	141,42	124,95	16,38	13,16	12,06	1,99	3,14	3,25									
E20-6	142,37	149,24	143,04	139,86	133,59	67,41	12,6	14,27	14,21	8,05	6,35	5,12									
E20-7	140,26			133,36	123	99,67	22,01	18,99	14,21	7	5,59	5,88									
E20-8	155,89	149,62	149,65	140,26	133,12	123,16	33,59	19,73	25,47	7	6,19	5,16									
E20-9	144,23	144,05	144,56	132,13	132,28	112,94	17,25	17,86	20,35	2,45	2,91	3,17									
E20-10	145,53	147,56	146,39	138,78	131,85	90,82	14,93	20,76	16,58	5,94	4,22	4,91									
E24-1	68,09	63,04	60,63	65,02	62,34	59,65	56,97	54,28	51,6	46,23	42,66		45,19	41,97	44,58	10,2	7,18	2,42		2,37	
E24-2	70,37	69,3	82,33	75,63	67,29	63,3	59,31	55,33	51,34	47,7	44,32	42,75	43,36	42,93	41,27	9,76	8,22	2,16		3,4	
E1-1	52,7	50,23	64,54	53,97	53,09	52,75	52,4	52,05	51,07	51,54	54,93	55,1	51,01	50,32	49,88	16,05	6,13	3,89		2,46	
E1-2	55	56,99	58,15	50,27	59,5	58,37	58,25	56,12	55	42,4	49,01	49,71	52,75	51,01	53,88	22,31	5,53	2,33		1,94	
E2-1	52,08	51,91	57,08	56,84	55,3	53,84	52,39	50,94	49,49	46,67	46,4	52,49	46,58	44,84	39,71	44,66	39,36	23,96		12,37	
E2-2	43,34	39,92	38,4	39,75	41,38	40,56	39,75	38,93	38,12	34,05	35,58	34,98	36,49	32,66	23,53	25,09	30,05	34,75		16,14	
E2-3	51,23	48,06	51,41	52,06	51,04	48,37	45,7	43,02	40,35	33,36	35,01	33,18	35,01	31,27	21,96	28,75	33,53	33,18		16,14	
E2-4	43,16	44,64	41,58	42,84	41,44	40,75	40,05	39,36	38,66	37,97	36,49	35,18	37,27	37,88	23,18	26,14	28,49	31,79		12,81	
E3	59,56	57,19	65,45	67,89	60,53	57,53	54,52	51,51	48,5	46,84	44,49	49,62	42,49	44,75	27,36	7,87	2,51	2,07		2,2	
E6	52,57	49,48	67,41	62,41	58,16	56,96	55,75	54,55	53,34	53,97	57,71	51,45	50,93	50,84	44,4	17,14	12,55	3,98		6,92	
E4-1	60,94	56,65	67,06	61,45	52,8	51,96	51,13	50,3	49,47	55,62	52,75	48,58	47,8	43,53	41,97	15,31	9,52	1,22		3,02	
E4-2	67,83	69,61	65,76	61,93	46,18	45,87	45,56	45,25	44,94	60,76	52,49	50,75	44,32	49,01	37,18	9,85	4,22	3,81		1,76	
E5	71,67	60,29	59,45		60,74	59,49	58,25	57,01	55,77	50,75	53,97	52,93	53,28	50,84	52,15	10,2	2,16	1,18			1,76

Adenda II

Influência da nutrição azotada e da salinidade no crescimento e na composição iônica de *Pisum sativum*: Tabelas de valores

Nesta adenda, encontram-se tabelados (AII-1 a AII-4b) os valores utilizados na elaboração dos gráficos IV-1, IV-2, IV-5 e IV-6, expressos no capítulo IV.

Tabela AI-1: Crescimento vegetativo radicular de plantas de *Pisum sativum* 'Resal', a crescerem ao longo de 75 dias, sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Os valores são médias (\pm DP) de 16 plantas.

Dias de crescimento	Condições de crescimento							
	0 mM NO ₃ ⁻	0 mM NO ₄ ⁺	0 mM NH ₄ NO ₃	0 mM <i>Rhizobium</i>	90 mM NO ₃ ⁻	90 mM NO ₄ ⁺	90 mM NH ₄ NO ₃	90 mM <i>Rhizobium</i>
15	1,56 \pm 0,15	0,96 \pm 0,12	0,59 \pm 0,09	0,48 \pm 0,08	0,33 \pm 0,05	0,29 \pm 0,07	0,37 \pm 0,04	0,46 \pm 0,05
30	2,05 \pm 0,26	1,49 \pm 0,17	3,13 \pm 0,52	1,61 \pm 0,50	1,31 \pm 0,18	0,66 \pm 0,08	0,45 \pm 0,13	1,86 \pm 0,48
45	2,99 \pm 0,33	3,14 \pm 0,47	6,36 \pm 0,60	2,11 \pm 0,57	0,78 \pm 0,20	0,83 \pm 0,16	0,78 \pm 0,2	2,69 \pm 0,48
60	4,13 \pm 0,66	4,17 \pm 0,52	9,65 \pm 1,28	3,94 \pm 1,15	0,88 \pm 0,18	0,90 \pm 0,08	0,84 \pm 0,15	2,69 \pm 0,45
75	5,14 \pm 0,37	4,57 \pm 0,62	9,13 \pm 1,33	2,99 \pm 0,83	0,88 \pm 0,13	0,58 \pm 0,18	0,83 \pm 0,21	2,24 \pm 0,59

Tabela AII-2: Crescimento vegetativo da parte aérea de plantas de *Pisum sativum* 'Resal', a crescerem ao longo de 75 dias, sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Os valores são médias (\pm DP) de 16 plantas.

Dias de crescimento	Condições de crescimento							
	0 mM NO ₃ ⁻	0 mM NO ₄ ⁺	0 mM NH ₄ NO ₃	0 mM <i>Rhizobium</i>	90 mM NO ₃ ⁻	90 mM NO ₄ ⁺	90 mM NH ₄ NO ₃	90 mM <i>Rhizobium</i>
15	1,02 \pm 0,12	0,54 \pm 0,05	0,48 \pm 0,06	0,72 \pm 0,08	1,15 \pm 0,10	0,86 \pm 0,16	0,94 \pm 0,16	0,93 \pm 0,08
30	3,35 \pm 0,47	2,38 \pm 0,37	4,44 \pm 0,60	3,05 \pm 0,53	2,37 \pm 0,19	0,56 \pm 0,14	1,00 \pm 0,31	2,32 \pm 0,79
45	4,34 \pm 0,71	4,46 \pm 0,61	7,51 \pm 0,72	4,40 \pm 0,94	3,57 \pm 0,52	2,06 \pm 0,44	3,57 \pm 0,52	4,91 \pm 0,62
60	11,2 \pm 1,51	9,52 \pm 0,54	19,61 \pm 2,28	6,83 \pm 1,68	8,37 \pm 2,18	6,43 \pm 1,33	7,53 \pm 1,92	5,30 \pm 1,40
75	6,31 \pm 0,15	11,7 \pm 0,78	34,22 \pm 1,87	5,03 \pm 2,83	7,71 \pm 3,28	5,18 \pm 1,81	5,16 \pm 2,07	4,65 \pm 1,87

Tabela AII-3a: Concentração de cátions solúveis na raiz de plantas de *Pisum sativum* 'Resal' cultivadas sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Os valores são médias (\pm DP) de 6 réplicas.

Dias de crescimento	Condições de crescimento							
	0 mM NO ₃ ⁻	0 mM NO ₄ ⁺	0 mM NH ₄ NO ₃	0 mM <i>Rhizobium</i>	90 mM NO ₃ ⁻	90 mM NO ₄ ⁺	90 mM NH ₄ NO ₃	90 mM <i>Rhizobium</i>
AMÔNIO (NH₄⁺)								
15	-	-	-	8,86 \pm 1,0	9,01 \pm 1,78	11,87 \pm 1,54	8,47 \pm 1,24	8,25 \pm 1,74
30	9,50 \pm 1,06	20,60 \pm 3,44	15,78 \pm 4,6	9,15 \pm 1,81	15,23 \pm 1,24	14,36 \pm 4,13	12,43 \pm 2,6	9,85 \pm 1,53
45	15,81 \pm 2,77	12,92 \pm 1,80	9,47 \pm 5,58	9,93 \pm 2,38	8,19 \pm 1,06	7,53 \pm 1,27	6,77 \pm 1,02	7,96 \pm 1,84
60	12,41 \pm 1,71	13,57 \pm 1,88	9,45 \pm 2,32	-	9,41 \pm 3,63	13,54 \pm 2,92	15,0 \pm 4,15	8,16 \pm 2,42
75	11,75 \pm 3,58	17,01 \pm 3,15	12,92 \pm 2,9	-	8,03 \pm 0,57	10,16 \pm 1,44	14,6 \pm 2,43	-
POTÁSSIO (K⁺)								
15	-	-	-	19,48 \pm 3,55	20,19 \pm 2,3	14,45 \pm 1,62	10,63 \pm 1,2	11,79 \pm 2,4
30	69,7 \pm 6,72	24,7 \pm 0,94	13,55 \pm 2,2	6,96 \pm 1,19	69,13 \pm 8,45	18,16 \pm 1,91	18,62 \pm 2,0	12,5 \pm 1,6
45	24,52 \pm 3,71	5,08 \pm 1,23	29,5 \pm 3,73	6,96 \pm 2,55	31,92 \pm 3,24	14,5 \pm 3,81	16,33 \pm 1,7	10,36 \pm 1,1
60	17,02 \pm 2,29	14,78 \pm 1,68	6,5 \pm 0,95	-	34,99 \pm 4,16	25,54 \pm 3,0	23,32 \pm 2,6	6,52 \pm 1,66
75	28,13 \pm 4,24	26,45 \pm 2,89	7,9 \pm 2,23	-	18,69 \pm 1,75	9,48 \pm 0,67	7,06 \pm 0,72	-
CÁLCIO (Ca²⁺)								
15	-	-	-	2,24 \pm 0,64	0,69 \pm 0,11	1,12 \pm 0,42	1,03 \pm 0,08	1,68 \pm 0,91
30	9,01 \pm 1,2	5,04 \pm 0,44	3,74 \pm 0,47	2,18 \pm 0,25	4,56 \pm 0,75	1,33 \pm 0,62	1,54 \pm 1,01	0,97 \pm 0,29
45	5,98 \pm 0,28	1,4 \pm 0,24	5,03 \pm 0,89	3,96 \pm 1,67	0,54 \pm 0,24	1,33 \pm 0,23	1,25 \pm 0,14	1,02 \pm 0,34
60	7,41 \pm 2,75	2,74 \pm 0,57	3,67 \pm 0,87	-	1,0 \pm 0,16	1,46 \pm 0,46	0,67 \pm 0,22	1,28 \pm 0,19
75	11,28 \pm 3,5	5,31 \pm 1,01	3,04 \pm 0,56	-	2,53 \pm 0,53	1,33 \pm 0,18	3,1 \pm 0,83	-
SÓDIO (Na⁺)								
15	-	-	-	68,12 \pm 8,03	42,15 \pm 0,94	47,5 \pm 8,09	50,46 \pm 6,0	69,3 \pm 4,63
30	14,58 \pm 3,41	18,85 \pm 1,68	37,47 \pm 4,1	67,6 \pm 6,89	125,1 \pm 10,73	39,6 \pm 8,19	110,0 \pm 7,8	46,06 \pm 7,6
45	13,13 \pm 1,86	10,91 \pm 1,88	21,3 \pm 4,46	75,29 \pm 11,54	51,37 \pm 7,84	28,6 \pm 9,74	41,1 \pm 5,55	45,11 \pm 4,097
60	13,4 \pm 9,2	43,8 \pm 5,32	22,9 \pm 2,63	-	183,6 \pm 9,83	105,8 \pm 8,8	126,1 \pm 5,3	37,3 \pm 3,93
75	19,11 \pm 2,66	19,0 \pm 2,89	12,7 \pm 2,55	-	59,07 \pm 7,93	50,07 \pm 5,73	37,4 \pm 6,53	-
MAGNÉSIO (Mg²⁺)								
15	-	-	-	11,35 \pm 1,91	3,17 \pm 0,41	3,13 \pm 0,4	3,64 \pm 0,43	5,7 \pm 1,7
30	6,51 \pm 0,77	2,95 \pm 0,72	8,69 \pm 1,53	6,46 \pm 0,86	8,4 \pm 2,02	2,23 \pm 0,65	3,58 \pm 0,6	4,32 \pm 0,93
45	2,99 \pm 0,38	1,39 \pm 0,12	9,1 \pm 1,42	4,4 \pm 0,79	4,39 \pm 0,42	2,12 \pm 0,28	6,58 \pm 0,98	3,18 \pm 0,42
60	4,1 \pm 1,79	1,94 \pm 0,48	2,12 \pm 0,48	-	8,49 \pm 0,89	6,1 \pm 0,42	5,84 \pm 0,64	2,7 \pm 0,65
75	2,3 \pm 0,07	2,01 \pm 0,23	1,13 \pm 0,14	-	2,43 \pm 0,4	9,38 \pm 0,44	12,66 \pm 0,4	-

AII-3b: Concentração de cátions solúveis na parte aérea de plantas de *Pisum sativum* 'Resal' cultivadas sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Os valores são médias (\pm DP) de 6 réplicas.

Dias de crescimento	Condições de crescimento							
	0 mM NO ₃ ⁻	0 mM NO ₄ ⁺	0 mM NH ₄ NO ₃	0 mM <i>Rhizobium</i>	90 mM NO ₃ ⁻	90 mM NO ₄ ⁺	90 mM NH ₄ NO ₃	90 mM <i>Rhizobium</i>
AMÔNIO (NH₄⁺)								
15	-	-	-	8,32 \pm 1,34	11,99 \pm 1,04	8,86 \pm 1,19	10,8 \pm 2,16	7,45 \pm 0,28
30	3,82 \pm 1,03	11,84 \pm 2,57	10,6 \pm 2,33	6,1 \pm 0,37	12,01 \pm 3,42	-	14,65 \pm 2,4	9,22 \pm 0,87
45	3,79 \pm 1,59	13,77 \pm 3,26	9,47 \pm 5,58	17,95 \pm 1,77	3,43 \pm 0,59	17,85 \pm 3,11	9,33 \pm 2,79	11,4 \pm 0,16
60	8,06 \pm 1,6	16,0 \pm 2,81	23,3 \pm 6,05	-	12,98 \pm 1,69	39,38 \pm 8,38	40,92 \pm 7,9	9,2 \pm 1,12
75	19,87 \pm 2,04	12,84 \pm 2,42	61,2 \pm 12,6	-	63,7 \pm 4,0	50,41 \pm 13,5	31,93 \pm 4,98	-
POTÁSSIO (K⁺)								
15	-	-	-	24,1 \pm 3,7	50,92 \pm 5,74	38,88 \pm 0,55	46,11 \pm 1,0	11,79 \pm 2,4
30	57,91 \pm 7,62	46,11 \pm 3,05	24,6 \pm 2,65	21,21 \pm 3,85	65,81 \pm 9,47	-	37,75 \pm 1,1	12,5 \pm 1,6
45	87,78 \pm 1,15	33,48 \pm 4,8	29,31 \pm 3,5	12,87 \pm 3,66	54,09 \pm 12,72	29,85 \pm 1,44	13,28 \pm 1,3	10,36 \pm 1,1
60	84,56 \pm 19,65	25,6 \pm 2,12	27,1 \pm 2,7	-	174 \pm 19,43	62,36 \pm 3,87	31,8 \pm 3,65	6,52 \pm 1,66
75	229,5 \pm 14,93	29,73 \pm 2,97	31,1 \pm 3,77	-	260,1 \pm 21,56	54,35 \pm 6,23	30,36 \pm 2,3	-
CÁLCIO (Ca²⁺)								
15	-	-	-	38,87 \pm 5,98	6,17 \pm 1,4	4,4 \pm 1,17	12,02 \pm 1,8	10,54 \pm 1,46
30	21,55 \pm 3,09	39,75 \pm 4,31	54,59 \pm 6,8	68,53 \pm 19,77	3,84 \pm 1,14	-	16,81 \pm 0,6	18,26 \pm 2,09
45	19,95 \pm 3,04	31,36 \pm 6,1	48,8 \pm 10,2	114,3 \pm 18,14	17,3 \pm 2,63	10,83 \pm 2,8	28,17 \pm 6,8	22,95 \pm 5
60	10,04 \pm 1,41	31,49 \pm 5,54	50,7 \pm 13,4	-	34,78 \pm 4,58	57,86 \pm 8,01	48,6 \pm 12,5	15,13 \pm 1,17
75	73,15 \pm 10,66	39,42 \pm 4,66	106 \pm 26,34	-	33,86 \pm 5,39	44,81 \pm 7,11	81,16 \pm 8,7	-
SÓDIO (Na⁺)								
15	-	-	-	18,76 \pm 3,43	33,92 \pm 1,73	60,55 \pm 7,23	35,43 \pm 2,5	48,24 \pm 4,7
30	8,38 \pm 0,77	11,75 \pm 2,7	15,97 \pm 2,7	34,61 \pm 6,98	32,88 \pm 12,67	136,7 \pm 14,46	124 \pm 10,21	41,62 \pm 3,6
45	17,31 \pm 3,46	10,91 \pm 1,9	24,78 \pm 2,6	94,87 \pm 10,66	55,81 \pm 8,83	212,8 \pm 36,15	106,8 \pm 6,1	66,99 \pm 6,88
60	36,05 \pm 1,82	138,8 \pm 64,3	59,24 \pm 0,7	-	131,3 \pm 22,08	273,5 \pm 40,84	245,4 \pm 54	86,13 \pm 12,64
75	38,79 \pm 3,09	22,66 \pm 5,04	114 \pm 19,7	-	682,5 \pm 114,6	316,4 \pm 22,4	412 \pm 40,6	-
MAGNÉSIO (Mg²⁺)								
15	-	-	-	8,21 \pm 0,96	5,53 \pm 0,54	5,66 \pm 0,82	7,54 \pm 1,13	6,37 \pm 1
30	4,49 \pm 0,61	8,96 \pm 0,82	6,74 \pm 0,66	12,74 \pm 1,27	7,38 \pm 0,99	-	9,62 \pm 1,72	7,92 \pm 0,78
45	4,62 \pm 0,58	12,41 \pm 2,57	9,14 \pm 1,48	26,3 \pm 2,57	5,79 \pm 0,78	17,13 \pm 2,44	10,43 \pm 1,5	9,67 \pm 1,56
60	4,38 \pm 0,77	10,25 \pm 0,9	11,6 \pm 1,23	-	30,37 \pm 4,12	27,15 \pm 6,09	24,11 \pm 9,7	5,88 \pm 0,51
75	13,49 \pm 1,94	9,36 \pm 1,61	23,48 \pm 3,7	-	52,33 \pm 18,45	38,02 \pm 4,26	44,19 \pm 6,8	-

Tabela AII-4a: Concentração de aniões solúveis na raiz de plantas de *Pisum sativum* 'Resal' cultivadas sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Os valores são médias (\pm DP) de 6 réplicas.

Dias de crescimento	Condições de crescimento							
	0 mM NO ₃ ⁻	0 mM NO ₄ ⁺	0 mM NH ₄ NO ₃	0 mM <i>Rhizobium</i>	90 mM NO ₃ ⁻	90 mM NO ₄ ⁺	90 mM NH ₄ NO ₃	90 mM <i>Rhizobium</i>
CLORO (Cl⁻)								
15	-	-	-	41,24 \pm 5,95	27,57 \pm 3,73	34,39 \pm 6,96	36,92 \pm 5,5	47 \pm 6,45
30	17,19 \pm 3,47	27,85 \pm 3,55	19,26 \pm 1,4	32,13 \pm 6,18	58,97 \pm 8,37	31,38 \pm 5,23	53,41 \pm 9,6	53,93 \pm 7
45	8,31 \pm 0,86	8,64 \pm 2,87	-	34,14 \pm 4,23	59,93 \pm 7,7	23,68 \pm 4,07	46,09 \pm 6,3	51,09 \pm 5,53
60	3,09 \pm 0,60	18,37 \pm 1,44	10,99 \pm 2,2	-	90,17 \pm 10,24	51,78 \pm 11,05	81,5 \pm 11,4	50,27 \pm 8,91
75	9,18 \pm 1,51	12,08 \pm 1,69	6,81 \pm 1,15	-	60 \pm 7,2	47,5 \pm 7,6	41,1 \pm 5,5	65,8 \pm 11,5
SULFATO (SO₄²⁻)								
15	-	-	-	26,43 \pm 2,39	7,95 \pm 1,4	9,83 \pm 0,66	12,97 \pm 2,2	7,4 \pm 2,26
30	5,82 \pm 0,62	9,5 \pm 1,46	6,76 \pm 0,95	26,98 \pm 1,72	16,34 \pm 2,87	5,27 \pm 1,11	11,78 \pm 1,7	6,63 \pm 1,21
45	3,6 \pm 0,14	2,07 \pm 0,3	-	20,77 \pm 2,86	12,59 \pm 2,81	3,59 \pm 0,66	12,25 \pm 1,8	6,83 \pm 0,5
60	2,43 \pm 0,55	11,45 \pm 1,37	4,58 \pm 0,65	-	22,19 \pm 2,81	16,88 \pm 2,08	24,0 \pm 2,81	4,62 \pm 1,51
75	22,96 \pm 4,06	8,87 \pm 1,93	1,89 \pm 0,31	-	8,4 \pm 1,1	7,5 \pm 1,3	8,5 \pm 0,7	3,7 \pm 0,2
NITRATO (NO₃⁻)								
15	7,38 \pm 1,55	-	-	0,96 \pm 0,28	3,59 \pm 0,35	1 \pm 0,21	2,92 \pm 0,27	0,93 \pm 0,12
30	14,76 \pm 1,55	0,87 \pm 0,12	3,45 \pm 0,58	1,39 \pm 0,09	1,37 \pm 0,14	1,33 \pm 0,06	3,96 \pm 0,36	0,65 \pm 0,09
45	15,58 \pm 1,97	4,61 \pm 0,59	8,22 \pm 0,1	2,01 \pm 0,4	0,82 \pm 0,14	1,08 \pm 0,13	1,58 \pm 0,33	1,11 \pm 0
60	10,22 \pm 1,64	7,84 \pm 1,06	12,98 \pm 2,4	-	2,24 \pm 0,13	2,84 \pm 0,34	6,91 \pm 0,62	1,08 \pm 0,37
75	11,6 \pm 1,51	2,7 \pm 0,45	17,28 \pm 1,4	-	1,4 \pm 0,3	1,2 \pm 0,1	4 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2
OXALATO								
	-	-	-	1,5 \pm 0,45	0,45 \pm 0	0,64 \pm 0,1	0,38 \pm 0,07	0,7 \pm 0,16
	0,36 \pm 0,06	0,25 \pm 0,03	0,39 \pm 0,07	1,37 \pm 0,24	0,54 \pm 0,09	0,27 \pm 0,06	0,26 \pm 0,08	0,59 \pm 0,11
	0,46 \pm 0,12	0,46 \pm 0,12	-	1,26 \pm 0,21	0,56 \pm 0,06	0,28 \pm 0,08	0,41 \pm 0,02	0,57 \pm 0,11
	0,25 \pm 0,09	0,43 \pm 0,04	0,31 \pm 0,04	-	0,43 \pm 0,03	0,26 \pm 0,07	0,39 \pm 0,07	0,38 \pm 0,03
	0,36 \pm 0,06	0,3 \pm 0,02	0,19 \pm 0,04	-	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0	0,6 \pm 0,2
CITRATO								
15	-	-	-	2,85 \pm 0,69	0,98 \pm 0	0,78 \pm 0,42	0,58 \pm 0	1,24 \pm 0,2
30	0,81 \pm 0,31	1,68 \pm 0,11	0,41 \pm 0,11	2,03 \pm 0,72	0,82 \pm 0,19	0,35 \pm 0,03	0,84 \pm 0,19	0,98 \pm 0,31
45	1,67 \pm 1,46	0,46 \pm 0,09	-	2 \pm 0,34	1,31 \pm 0,22	0,78 \pm 0,19	1,05 \pm 0,52	0,93 \pm 0,15
60	0,4 \pm 0,33	0,35 \pm 0,09	0,91 \pm 0,11	-	0,78 \pm 0,18	1,54 \pm 0,37	0,8 \pm 0	0,82 \pm 0
75	0,58 \pm 0,13	0,98 \pm 0,11	1,3 \pm 0,17	-	1,3 \pm 0	2,4 \pm 0	0,7 \pm 0	2,5 \pm 0,3
FOSFATO INORGÂNICO (Pi)								
15	-	-	-	15,17 \pm 0,78	3,61 \pm 1,39	10,42 \pm 3,43	7,55 \pm 1,24	10,94 \pm 1,19
30	7,22 \pm 1,41	9,31 \pm 1,02	7,05 \pm 1,26	14,74 \pm 3,17	7,38 \pm 1,07	21,73 \pm 2,05	9,83 \pm 0,94	6,6 \pm 1,05
45	1,88 \pm 0,5	1,82 \pm 0,33	-	8,73 \pm 1,67	3,13 \pm 0,18	8,77 \pm 2,82	6,48 \pm 0,42	5,95 \pm 0,63
60	1,75 \pm 0,38	2,97 \pm 0,45	2,88 \pm 0,57	-	4,15 \pm 1,23	35,63 \pm 4,18	5,44 \pm 0,82	5,32 \pm 0,44
75	3,83 \pm 0,22	6,04 \pm 1,28	5,71 \pm 1,86	-	2,2 \pm 0,6	19,8 \pm 3	2,2 \pm 0,6	3 \pm 0,9

Tabela AII-4b: Concentração de ânions solúveis na parte aérea de plantas de *Pisum sativum* 'Resal' cultivadas sob diferentes condições de salinidade e nutrição azotada. Os valores são médias (\pm DP) de 6 réplicas.

Dias de crescimento	Condições de crescimento							
	0 mM NO ₃ ⁻	0 mM NO ₄ ⁺	0 mM NH ₄ NO ₃	0 mM <i>Rhizobium</i>	90 mM NO ₃ ⁻	90 mM NO ₄ ⁺	90 mM NH ₄ NO ₃	90 mM <i>Rhizobium</i>
CLORO (Cl⁻)								
15	-	-	-	33,74 \pm 4,35	37,41 \pm 2,16	51,34 \pm 8,26	44,9 \pm 7,86	62,09 \pm 7,32
30	25,5 \pm 1,79	81,38 \pm 7,53	36,84 \pm 6,1	19,55 \pm 2,15	55,3 \pm 7,25	238,2 \pm 36,58	65,8 \pm 13,8	64,24 \pm 10,47
45	26,31 \pm 4,19	61,3 \pm 6,05	41,1 \pm 6,04	94,46 \pm 16,49	73,91 \pm 14,47	160,8 \pm 38,23	86,7 \pm 19,7	94,01 \pm 9,05
60	71,94 \pm 5,52	179,7 \pm 20,04	103,7 \pm 17	-	110,2 \pm 14,75	286,1 \pm 57,44	136,6 \pm 20	100,7 \pm 12,12
75	75,29 \pm 15,05	48,5 \pm 5,84	49,39 \pm 7	-	276,7 \pm 48,8	309,5 \pm 26,42	297,4 \pm 54	402,1 \pm 47,99
SULFATO (SO₄²⁻)								
15	-	-	-	17,54 \pm 1,68	5,33 \pm 0,46	7,98 \pm 1,97	8,78 \pm 1,18	7,58 \pm 0,54
30	1,89 \pm 0,17	12,67 \pm 1,83	7,37 \pm 1,03	3,58 \pm 0,72	5,64 \pm 1,04	-	21,45 \pm 4,1	6,08 \pm 1,29
45	1,85 \pm 0,26	19,73 \pm 3,79	4,19 \pm 0,34	6,16 \pm 0,91	6,27 \pm 0,92	13,89 \pm 2,64	15,9 \pm 2,56	9,3 \pm 0,98
60	7,85 \pm 1,33	20,11 \pm 7,12	15,05 \pm 1,5	-	10,81 \pm 2,1	19,54 \pm 3,98	22,6 \pm 2,97	4,18 \pm 0,63
75	40,19 \pm 7,63	20,08 \pm 2,57	39,21 \pm 9	-	30,47 \pm 1,65	16,62 \pm 1,84	15,74 \pm 1,8	24,3 \pm 1,29
NITRATO (NO₃⁻)								
15	-	-	-	0,84 \pm 0,13	3,31 \pm 0,49	0,6 \pm 0,11	1,34 \pm 0,24	0,7 \pm 0
30	3,62 \pm 0,07	0,73 \pm 0,18	2,06 \pm 0,41	0,84 \pm 0,08	0,97 \pm 0,23	-	1,47 \pm 0,03	0,56 \pm 0,13
45	9,46 \pm 0,12	0,8 \pm 0,14	4,57 \pm 0,62	0,65 \pm 0,02	0,93 \pm 0,18	1,09 \pm 0,17	1,58 \pm 0,4	0,96 \pm 0,14
60	10,78 \pm 1,88	0,89 \pm 0,19	4,8 \pm 0,95	-	0,87 \pm 0,25	0,84 \pm 0,13	0,91 \pm 0,2	-
75	70,13 \pm 8,16	17,57 \pm 2,36	20,88 \pm 7,3	-	5,38 \pm 0,67	0,44 \pm 0,14	6,53 \pm 0,65	0,86 \pm 0,29
OXALATO								
	-	-	-	2,02 \pm 0,35	0,54 \pm 0,02	0,64 \pm 0,09	0,7 \pm 0,25	0,6 \pm 0,11
	3,62 \pm 0,07	0,62 \pm 0,07	0,68 \pm 0,09	1,64 \pm 0,04	1,14 \pm 0,16	-	0,98 \pm 0,29	0,8 \pm 0,1
	9,46 \pm 0,12	0,64 \pm 0,05	0,85 \pm 0,21	0,61 \pm 0,1	0,78 \pm 0,23	0,47 \pm 0,11	0,69 \pm 0,12	1,17 \pm 0,01
	10,78 \pm 0,12	0,26 \pm 0,05	0,83 \pm 0,12	-	0,79 \pm 0,16	0,5 \pm 0,15	0,41 \pm 0,05	0,31 \pm 0,02
	17,57 \pm 0,1	0,35 \pm 0,04	0,66 \pm 0,15	-	0,37 \pm 0,09	0,31 \pm 0,05	0,44 \pm 0,02	2,74 \pm 0,09
CITRATO								
15	-	-	-	1,53 \pm 0,43	0,59 \pm 0,05	0,54 \pm 0,04	1,26 \pm 0	1,15 \pm 0,22
30	2,01 \pm 0	0,91 \pm 0,22	0,62 \pm 0,05	1,68 \pm 0,64	0,44 \pm 0,16	-	0,83 \pm 0,32	0,98 \pm 0,13
45	1,64 \pm 0,41	1,28 \pm 0,77	1,31 \pm 0,21	1,4 \pm 0,04	0,93 \pm 0,17	0,38 \pm 0,11	0,51 \pm 0,08	1,06 \pm 0,39
60	0,77 \pm 0,24	1,08 \pm 0,35	1,03 \pm 0,12	-	1,18 \pm 0,29	0,63 \pm 0,07	0,85 \pm 0,18	0,22 \pm 0,04
75	2,01 \pm 0,52	1,12 \pm 0,22	0,98 \pm 0,2	-	0,99 \pm 0,29	0,53 \pm 0,1	0,68 \pm 0,17	4,58 \pm 0,36
FOSFATO INORGÂNICO (Pi)								
15	-	-	-	42,75 \pm 17,09	18,57 \pm 2,37	10,39 \pm 1,88	15,9 \pm 3,4	6,84 \pm 1,17
30	22,18 \pm 3,59	17,44 \pm 3,55	32,96 \pm 6,4	35,92 \pm 11,02	14,84 \pm 5,17	-	9,02 \pm 1,38	5,23 \pm 0,43
45	27,92 \pm 2,91	13,57 \pm 1,56	30,22 \pm 5,7	31,32 \pm 11,51	11,58 \pm 2,45	14,32 \pm 1,23	15,55 \pm 0,6	9,18 \pm 1,48
60	15,64 \pm 5,93	24,7 \pm 4,03	54,1 \pm 8,65	-	16,29 \pm 6,15	18,87 \pm 2,94	10,67 \pm 1,6	4,13 \pm 1,2
75	50,14 \pm 2,21	49,34 \pm 7,51	22,2 \pm 10,4	-	10,4 \pm 3,76	15,55 \pm 1,23	6,23 \pm 1,5	2,69 \pm 0,76