

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

SEMENTES DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS SOB
ESTRESSE SALINO TRATADAS COM ÁCIDO
SALICÍLICO E ESPERMIDINA

Antonio Pizolato Neto
Engenheiro Agrônomo

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

SEMENTES DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS SOB
ESTRESSE SALINO TRATADAS COM ÁCIDO
SALICÍLICO E ESPERMIDINA

Antonio Pizolato Neto

Orientador: Prof^a. Dr^a Durvalina M. M. dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

2016

P695s Pizolato Neto, Antonio
Sementes de leguminosas forrageiras sob estresse salino
tratadas com ácido salicílico e espermidina / Antonio Pizolato Neto. –
– Jaboticabal, 2016
x, 43 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Durvalina Maria Mathias dos Santos
Banca examinadora: Priscila Lupino Gratão, Sonia Cristina
Juliano Gualtieri
Bibliografia

1. Salinidade. 2. Poliaminas. 3. Salicilatos. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.811:633.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

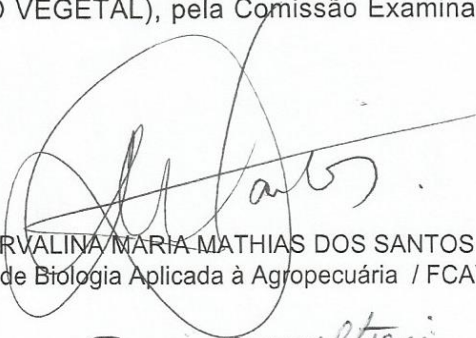
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: SEMENTES DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS SOB ESTRESSE SALINO
TRATADAS COM ÁCIDO SALICÍLICO E ESPERMIDINA

AUTOR: ANTONIO PIZOLATO NETO

ORIENTADORA: DURVALINA MARIA MATHIAS DOS SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DURVALINA MARIA MATHIAS DOS SANTOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Sonia Gualtieri
Profa. Dra. SONIA CRISTINA JULIANO GUALTIERI
Departamento de Botânica / UFSCar - São Carlos/SP



Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANTONIO PIZOLATO NETO – nascido em 16 de março de 1990, em Uberaba, MG, é Engenheiro Agrônomo formado pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM), em maio de 2013. Foi bolsista de iniciação científica voluntário no período de 2008 a 2009 e no CNPq de 2010 a 2013. Em Agosto de 2014 iniciou o curso de mestrado em Agronomia, na área de Concentração em Produção Vegetal, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Câmpus Jaboticabal. Durante o período de realização do curso de mestrado, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

“Viver é sempre dizer aos outros que elas são importantes. Que nós os amamos, porque um dia eles se vão, e ficamos com a nítida impressão de que não os amamos o suficiente.”

(Chico Xavier)

Dedico,

Aos meus pais, Valdeci (*in memoriam*) e Regina e toda a minha família pelo amor, carinho e dedicação, que me ajudaram a fazer as melhores escolhas e mostraram os valores essenciais da vida.

As minhas irmãs Bruna e Renata, pelo carinho e apoio que me deram.

Aos meus sobrinhos João Vítor, Maria Eduarda, Guilherme e Gustavo pelas brincadeiras e os sorrisos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, primeiramente, por ter certeza que ele esteve presente em todos os momentos, me dando força, me iluminando nas decisões difíceis.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal e a ao Programa de Produção Vegetal pela oportunidade e aprendizado.

A Profa. Dra. Durvalina M. M. dos Santos, pela orientação, ensinamentos e a dedicação para realização desse trabalho.

A Sônia Maria Raimundo Carregari, pelos ensinamentos no laboratório, pelo auxílio nos experimentos e por sua grande amizade. Sem você, os dias difíceis seriam mais árduos.

As amigas Ayza e Amanda, pelo carinho e amizade.

Aos novos amigos de Jaboticabal, Ana Rita, Ana Rosália, Andreísa, Bianca, Carol, Denise, Gilmar, Neriane, Rita de Cássia, Sophia e Willians, muito obrigado pelo apoio e amizade.

Aos demais professores e funcionários, pelo apoio técnico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma durante esta etapa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Germinação de sementes	3
2.2 Estresse salino.....	4
2.3. Estresse oxidativo	5
2.2. Ácido salicílico.....	6
2.3. Poliamina espermidina.....	6
2.4. Leguminosas forrageiras.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Condução do experimento e obtenção das sementes	10
3.2. Fatores em estudo e delineamento estatístico.....	10
3.3. Instalação do experimento	11
3.5. Parâmetros bioquímicos e fisiológicos	12
3.5.1. Germinação	12
3.5.2. Peroxidação de lipídeos.....	12
3.5.3. Extração e análise das enzimas antioxidantes	13
3.5.4 Determinação da concentração de proteínas	14
3.5.5. Teores de glicina betaína.....	14
3.5.6. Crescimento de plântulas	14
3.6. Análise estatística	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. Germinação (G)	16
4.3. Peroxidação de lipídios	18

4.2. Enzimas antioxidantes	20
4.2.1. Superóxido dismutase (SOD)	20
4.2.2. Catalase (CAT)	22
4.2.3. Ascorbato peroxidase (APX).....	24
4.4. Teores de glicina betaína (GB)	26
4.5. Crescimento de plântulas.....	28
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS.....	33

SEMENTES DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS SOB ESTRESSE SALINO TRATADAS COM ÁCIDO SALICÍLICO E ESPERMIDINA

RESUMO – A germinação de sementes é um processo crítico no ciclo vital das plantas superiores e muito susceptível às condições adversas do ambiente, as quais podem causar o estresse oxidativo, resultante do aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem causar danos às proteínas e iniciar a peroxidação lipídica nas membranas celulares. A aplicação do ácido salicílico e espermidina é de grande importância na proteção do tecido vegetal dos efeitos prejudiciais dos estresses, restaurando os padrões normais de crescimento evidenciando a função essencial no metabolismo celular. Diante disso o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos do estresse salino na germinação e no crescimento inicial de duas espécies de leguminosas forrageiras, guandu cv. BRS Mandarin e labe-labe cv. Rongai, avaliando-se os seguintes parâmetros bioquímicos-fisiológicos: i) efeito exógeno do ácido salicílico e da poliamina espermidina; ii) atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbatoperoxidase (APX) e catalase (CAT). iii) peroxidação lipídica e iv) teores de glicina betaína. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x2x4+1, sendo as duas cultivares, guandu, cv. BRS Mandarin (C1) e labe-labe cv. Rongai (C2); dois tipos de atenuadores (0,5 mM de AS ou Spd); quatro concentrações de cloreto de sódio (NaCl) para induzir diferentes níveis de estresse salino, expressos em mM: 0,0 (S1); 20 (S2); 40 (S3) e 60 (S4). Nas plantas sob salinidade, a Spd e o AS aumentaram o crescimento da parte aérea das espécies, mas diminuíram a germinação e o crescimento de raízes nas plântulas. A Spd aumentou a atividade da CAT, enquanto que o AS aumentou a atividade da SOD e da APX, nas plântulas sob estresse salino. O uso do AS e da Spd ocasionaram no decréscimo de glicina betaína. O labe-labe é menos sensível ao estresse salino estudado que o guandu. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os compostos (Spd e AS) são benéficos para atenuação do estresse salino em ambas as forrageiras estudadas.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, *Cajanus cajan*, *Lablab purpureus*, poliaminas, salicilatos e salinidade.

FORAGE LEGUMES SEEDS UNDER SALT STRESS TREATED WITH SALICYLIC ACID AND SPERMIDINE

ABSTRACT – Seed germination is a critical process in the life cycle of superior plants and very susceptible to adverse environmental conditions which can cause oxidative stress, resulting from the increase of reactive oxygen species (EROS), which may cause damage to proteins and initiate lipid peroxidation in cell membranes. The application of salicylic acid and spermidine is a great importance in protecting the plant tissue from the harmful stress effects, restoring the normal growth standards showing the key role in cell metabolism. In view of that, the aim of this study was verify the effects of salt stress on germination and initial growth of two species of forage legumes, pigeonpea cv. BRS Mandarin and lablab bean cv. Rongai evaluating the following biochemical and physiological parameters: i) exogenous effect of salicylic acid and polyamine spermidine; ii) activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT); iii) lipid peroxidation; iv) content of glycine betaine. The statistics experimental design was randomized completely in a factorial scheme 2x3x4, the two cultivars, pigeonpea cv. BRS Mandarin (C1) and lablab bean cv. Rongai (C2); Two types of attenuators (0.5 mM AS or Spd); four concentrations of sodium chloride (NaCl) to induce different levels of salt stress, expressed in mM: 0.0 (S1); 20 (S2); 40 (S3) and 60 (S4) . In plants under salinity, the Spd and AS increased the aerial parts of the species, but decreased germination and root growth in seedlings. The Spd increased the CAT activity, while the AS increased the SOD and APX acitivity, in the seedlings under salt stress. The use of AS and Spd caused decrease in glycine betaine. The lablab bean is less sensitive to salt stress than Guandu studied in this experiment. The obtained results in this experiment showed that the compounds (Spd and AS) are beneficial for mitigation of salt stress in both studied forages.

Keywords: oxidative stress, *Cajanus cajan*, *Lablab purpureus*, polyamines, salicylates and salinity.

1. INTRODUÇÃO

O estresse salino ocorre não somente nas regiões áridas e semiáridas, mas em muitas outras regiões do mundo distribuídas em vastas áreas nos diversos países. Estima-se que mais de 20% das áreas cultivadas ao redor do mundo são afetadas pelo estresse salino, e a quantidade de áreas propícias a este estresse está aumentando rapidamente (MUNNS; TESTER, 2008; COELHO et al., 2010; GUPTA; HUANG, 2014). Existe o risco de ampliação das áreas que apresentam solos salinos, caso não sejam adotadas medidas adequadas de manejo do solo e da água (PINHEIRO, 2013).

Considerado um dos estresses que mais limitam a produção de culturas agrônômicas ao redor do mundo, o estresse salino promove drásticas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nos vegetais. A maioria das espécies vegetais submetidas à salinidade tem o crescimento reduzido afetando a produtividade, sobretudo, devido aos efeitos osmóticos, toxicidade iônica, desequilíbrio nutricional e hormonal e produção de espécies reativas de oxigênio (HAMDIA; SHADDAD, 2010).

Na solução salina do solo, a água é osmoticamente retida, de forma que o aumento da concentração de sais torna a água cada vez menos disponível para as sementes, afetando diretamente a germinação e o crescimento inicial das plântulas (MUNNS; TESTER, 2008). Em sementes sob estresse salino ocorre grande interferência na qualidade fisiológica acelerando o envelhecimento e diminuindo acentuadamente o vigor, comprometendo a obtenção de estande adequado para o estabelecimento da cultura (JAYAKANNAM et al., 2013; TANG et al., 2015). A importância do estudo da germinação das sementes em substratos salinizados é um dos métodos mais utilizados para se determinar a tolerância das plantas ao excesso de sais. Para algumas plantas, a avaliação do processo germinativo pode ser indicativo da tolerância aos ambientes salinizados (DANTAS et al., 2007).

De modo geral as condições de estresse desencadeiam alterações metabólicas na fisiologia das plantas, como a intensificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que em excesso conduzem ao estresse oxidativo, o qual pode ser combatido por vários processos, entre eles o enzimático.

Diante disso o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos do estresse salino na germinação e no crescimento inicial de duas espécies de leguminosas forrageiras, guandu cv. BRS Mandarin e labe-labe cv. Rongai, avaliando-se os seguintes parâmetros bioquímicos-fisiológicos: i) efeito exógeno do ácido salicílico e da poliamina espermidina; ii) atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbatoperoxidase (APX) e catalase (CAT). iii) peroxidação lipídica e iv) teores de glicina betaína. Com este estudo, hipotetiza-se que tanto o ácido salicílico como a poliamina espermidina poderão atenuar o estresse salino na germinabilidade de ambas leguminosas forrageiras, pelo incremento da atividade das enzimas antioxidantes; nesse contexto, espera-se que essas enzimas possam ser utilizadas como marcadores bioquímico-fisiológicos para ajustar osmoticamente as sementes dessas leguminosas forrageiras aos efeitos do estresse salino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Germinação de sementes

A germinação de sementes é um processo crítico no ciclo vital das plantas superiores e muito susceptível às condições adversas do ambiente, as quais podem causar o estresse oxidativo, resultante do aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem causar danos às proteínas e iniciar a peroxidação lipídica nas membranas celulares, formando hidroperóxidos de lipídeos (SHARMA et al., 2012). Esta peroxidação de lipídeos de membrana é um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo, pelo fato de causar a diminuição da fluidez, modificações de permeabilidade iônica e de outras funções associadas às membranas (TAMÁS et al., 2004).

Os eventos bioquímicos resultantes de diminuição da fluidez das membranas incluem a interferência nas funções das proteínas, a redução do suprimento de energia, a perda de compartimentalização, a liberação acentuada de íons e outros eventos que rompem o metabolismo normal e levam ao desbalanço e perda das funções essenciais. A avaliação da peroxidação de lipídeos de membranas evidenciada pela produção de malondialdeído (MDA), subproduto ligado à peroxidação de lipídeos, frequentemente, é utilizada como indicador bioquímico chave da sensibilidade das plantas aos estresses ambientais (SHARMA et al., 2012).

Outro mecanismo bioquímico-fisiológico das plantas sob condições de estresse é o ajuste osmótico, que se dá a partir da biossíntese de solutos compatíveis, como a glicina betaína, que se acumula no vacúolo ou citosol das células e tem função osmoprotetora, mantendo a integridade celular das proteínas, enzimas e membranas (JALEEL et al., 2007; PAREEK et al., 2010). A glicina betaína, é uma das betaínas mais comuns nas plantas e é sintetizada como osmólito compatível em plantas sob condições estressantes (FAROOQ et al., 2009; PAREEK et al., 2010). O acúmulo de osmólitos compatíveis é uma efetiva avaliação para incrementar a tolerância dos vegetais ao estresse salino (TANG et al., 2015). Plantas tolerantes ao estresse salino sintetizam glicina betaína em maiores

quantidades que plantas sensíveis a este estresse (HAMDIA; SHADDAD, 2010; GUPTA; HUANG, 2014).

De modo geral a presença de sais no solo inibe a habilidade da planta em absorver água, conduzindo à redução do seu desenvolvimento. Este é o efeito osmótico que leva à deficiência hídrica promovida pela salinidade. A absorção excessiva de íons do solo como Na^+ e Cl^- promove similarmente ao efeito osmótico, a redução do crescimento e este é o efeito iônico da salinidade sobre as plantas (MANSOUR, 2014). O íon Na tem um efeito adverso sobre o desenvolvimento das plantas, quando presente em grandes concentrações no solo, devido sua ação inibir a atividade de várias enzimas do metabolismo respiratório e fotossintético.

2.2 Estresse salino

A Salinização de solos agricultáveis origina-se, sobretudo, da água de irrigação que contem quantidades traços de cloreto de sódio (NaCl) e de água do mar (MANSOUR, 2014). Solos salinos apresenta alta concentração de sais solúveis e são classificados como tais quando sua condutividade elétrica é maior ou igual que 4 dS m^{-1} . Esta definição de salinidade deriva da condutividade elétrica obtida a partir do extrato saturado do solo, que reduz a produção de várias culturas. Entretanto, muitas espécies são afetadas por uma condutividade elétrica inferior a 4 dS m^{-1} (MUNNS; TESTER, 2008).

O estresse salino causa uma influência desvantajosa na planta e é um dos fatores abióticos de grande importância (Taiz; Zeiger, 2004). Existem três maneiras da indução do estresse salino na planta: osmótico, iônico e oxidativo. A planta desenvolve diferentes mecanismos para se proteger contra cada um deles. No caso de estresse osmótico, o mecanismo de proteção da planta é o ajustamento osmótico ou homeostase osmótica. Se o estresse for iônico, o mecanismo será a homeostase iônica, que compreende o balanço K/Na, a exclusão de Na e a compartimentalização e, por fim, no caso do estresse oxidativo a resposta da planta é a defesa antioxidante (SILVEIRA et al., 2010).

Sendo assim é nítido que com o estresse é gerado uma situação desfavorável, afetando negativamente o metabolismo da planta resultando na diminuição do crescimento e desenvolvimento do vegetal (LICHTENTHALER, 2004).

2.3. Estresse oxidativo

As plantas possuem mecanismos de defesa quando submetidas aos estresses. O estresse oxidativo é uma das respostas fisiológicas da planta após o estresse salino, e também pode estar relacionado aos mecanismos de defesa.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) em condições ambientais naturais protegem as plantas, porém, sob condições de estresse são produzidas em grande quantidade, tornando-se tóxicas e capazes de causar efeitos deletérios através de reações de oxidação. (STRID et al., 1994; BANDYOPADHYAY; BANERJEE, 1999; BROWN et al., 2013).

A oxidação pode ocorrer em vários componentes celulares e com isso levar à destruição oxidativa de células, que induzem os danos celulares através da degradação de proteínas, inativação de enzimas, alterações em genes e interferem em rotas metabólicas importantes (AZEVEDO NETO et al., 2015).

As ERO resultam da excitação eletrônica do O_2 para formar oxigênio singlete (O_2^1) ou da transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 para formar, respectivamente o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxil (OH^-) (SAHA et al., 2015).

Assim os níveis endógenos de ERO, possibilita a sua utilização como moléculas sinalizadoras no crescimento, desenvolvimento e respostas a estresses (RYTER; TYRREL, 1998; MITTLER et al., 2004).

Nas plantas, cada compartimento celular contém enzimas que limitam o acúmulo de ERO, mas que sob algum tipo estresse, tais enzimas podem não atuar eficientemente, a ponto de haver danos às estruturas celulares e subcelulares (MOLLER; SWEETLOVE, 2010). Isto ocorre devido a um desequilíbrio entre formação e neutralização das ERO pelos sistemas enzimáticos, conduzindo aos distúrbios metabólicos, que vão desde danos ao material genético e proteínas, até peroxidação de lipídeos de membranas evidenciada pela produção de malondialdeído (subproduto ligado à peroxidação de lipídeos), comumente usado como uma medida de tolerância a estresses impostos as plantas, incluso o estresse salino (YASAR et al., 2008).

2.2. Ácido salicílico

O ácido salicílico (AS) é um regulador vegetal endógeno que pertence a um grupo muito diversificado de substâncias conhecidas como compostos fenólicos. A função do AS é explorada na literatura nos estudos da relação planta-patógeno (FU; DONG, 2013). Outra importante função do AS nas plantas está relacionada à indução de tolerância aos diferentes tipos de estresse abiótico. Recentes estudos tem dado considerável importância à habilidade do AS em induzir efeitos de proteção (adaptação e tolerância) em plantas sob estresse (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Segundo Chen et al. (1993), adaptação e tolerância é devido às alterações no metabolismo da célula vegetal, entre elas a síntese de proteínas de defesa, expressas por genes específicos, ativados através de mecanismos complexos. Tais proteínas exercem vários papéis na tolerância e sobrevivência da planta, de forma direta (combatendo o agente agressor) ou indireta (mantendo a estrutura e as funções celulares).

A aplicação exógena do ácido salicílico pode agir como indutor dessas proteínas de tolerância aos diferentes estresses, destacando o estresse salino (JAYAKANNAN et al., 2013). Bem como para elevar/regular a atividade de enzimas de desintoxicação celular, como a catalase, peroxidases e superóxido-dismutases, especialmente envolvidas na degradação de radicais ativos oxigenados (CARVALHO et al., 2007; GUO et al., 2013). Os efeitos atenuadores do AS pode estar envolvido também pelo aumento do osmólito compatível glicina betaína (NOREEN et al., 2008; LAKZAYI et al., 2014).

De modo geral o efeito protetor é dependente de uma série de fatores tais como a espécie, o estágio de desenvolvimento da planta, o modo de aplicação, a concentração de AS utilizada, o seu nível endógeno na planta em questão e o balanço oxidativo das células (HORVÁTH et al., 2007).

2.3. Poliamina espermidina

As poliaminas apresentam ocorrência natural em plantas e se caracterizam por serem substâncias de baixo peso molecular, policatiônicas, alifáticas e nitrogenadas (FARIDUDDIN et al., 2013). Algumas plantas utilizam as poliaminas (putrescina, espermidina, espermina e cadaverina) para a defesa contra as

condições adversas, pelo fato destas possuírem vias metabólicas interconectadas com outras rotas envolvidas na formação de várias moléculas e metabólitos sinalizadores relevantes nas respostas das plantas sob estresses (PAL; SZALAI; JANDA, 2015).

Estudos recentes destacam o envolvimento das poliaminas na proteção das plantas cultivadas submetidas à restrição hídrica e salinidade (GUPTA et al., 2013; KOTAKIS et al., 2014). Muitos autores observaram que poliaminas exógenas causam atenuação dos efeitos de vários estresses nos vegetais aumentando a tolerância das culturas (SHARMA et al., 2011; GUPTA et al., 2013; KOTAKIS et al., 2014).

Ainda, pode evidenciar que são essenciais para a viabilidade das células, pois as poliaminas estão envolvidas em processos celulares importantes como a divisão celular, síntese proteica, replicação do DNA e prevenção dos processos relacionados com a senescência (CHATTOPADHAYAY et al., 1997; AZIZ et al., 2001; ZEID, 2004).

Dentre as poliaminas responsáveis pelo metabolismo e pelas respostas das sementes ao ambiente, destaca-se a espermidina, família das aminas (triamina), a qual está entre as principais poliaminas nas plantas que atuam em vários processos fisiológicos relacionados às respostas dos vegetais aos diversos tipos de estresses, incluindo o estresse salino (ZHAO; QIN, 2004; DALBERTO; BRAGA, 2013).

Esta importância ainda se confirma pela aplicação exógena de espermidina em sementes, na qual tem mostrado proteger o tecido vegetal dos efeitos prejudiciais dos estresses, restaurando os padrões normais de crescimento evidenciando a função essencial no metabolismo celular (TASSONI et al., 2008; AHMAD et al., 2009). Assim, tendo em vista estes aspectos das funções das poliaminas, crescente interesse tem surgido no tocante à manipulação genética da sua biossíntese, com o objetivo de tornar as plantas mais tolerantes aos vários estresses ambientais.

2.4. Leguminosas forrageiras

Devido à alta produção de ruminantes no Brasil, a utilização de pastagens é de grande importância. Aproximadamente 75% da superfície utilizada pela

agricultura é ocupada por pastagens, o que corresponde a aproximadamente 20% da área total do País (FAGUNDES et al., 2011).

As forrageiras apresentam uma grande importância, devido à possibilidade na alimentação dos animais. A criação dos ruminantes é baseada em sistema de pastagens (gramíneas e leguminosas), sendo economicamente a fonte alimentar mais viável em um sistema produtivo, pois seu custo é relativamente barato em comparação às fontes alimentares tradicionais dentre elas milho, soja e sorgo sendo que estes compõem grande parte da dieta dos animais criados em sistema intensivo (SILVA et al., 2016).

A utilização do guandu e labe-labe como forragem são de grande aceitação, pois apresentam repostas satisfatórias em termos de cobertura e quanto à massa seca.

O guandu (Figura 1A) é uma leguminosa, da família Fabaceae, nativa da África tropical ocidental, com folhas alternadas trifoliadas, inflorescências com flores amarelas ou amarelas com estrias avermelhadas ou roxas. As suas vagens possuem sementes de coloração variável. É uma planta anual, bianual ou semiperene, que cresce bem em solos tropicais e subtropicais, com bastante tolerância à seca (KHOURY et al. 2015). Essa planta possui a capacidade de fixar elevada quantidade de nitrogênio, produção de fitomassa, ciclagem de nutrientes, além de reduzir problemas com a compactação do solo. Pode ser empregado: como adubo verde, em rotação e associação de cultivos, em consorciação com gramíneas anuais, na alimentação animal, na produção de grãos, entre outras (CALEGARI et al., 1993; MENEZES et al., 2009).

O labe-labe (Figura 1B) é uma leguminosa, da família Fabaceae, com ciclo de vida anual ou bianual, originário da África ou Índia, herbácea, com inflorescência de ramos auxiliares pedunculados, flores de cor branca, rosada ou violácea (MAASS et al., 2010; AZEVEDO et al. 2007). A mesma possui hábito de crescimento indeterminado, de clima tropical e subtropical, é tolerante às secas prolongadas, adaptando-se aos diversos tipos de solos. O seu uso pode ser adotado para a alimentação humana, por meio dos grãos e como forragem verde para bovinos (MURPHY; COLUCCI, 1999).



Figura 1. **A.** guandu, cv. BRS Mandarin; **B.** Labe-labe cv. Rongai.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condução do experimento e obtenção das sementes

O experimento foi conduzido em sala de crescimento na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Univ Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Laboratório de Fisiologia Vegetal. Foram utilizadas sementes de guandu, cv. BRS Mandarin (*Cajanus cajan*) e labe-labe cv. Rongai (*Lablab purpureus*) provenientes da empresa Wolf Seeds do Brasil, Ribeirão Preto.

3.2. Fatores em estudo e delineamento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x3x4, sendo as duas cultivares, guandu, cv. BRS Mandarin (C1) e labe-labe cv. Rongai (C2); dois tipos de atenuadores (0,5 mM de AS ou Spd); quatro concentrações de cloreto de sódio (NaCl) para induzir diferentes níveis de estresse salino, expressos em mM: 0,0 (S1); 20 (S2); 40 (S3) e 60 (S4), as concentrações usadas foram de acordo com Monteiro et al. (2014). Estes níveis de estresse salino correspondem, respectivamente, aos potenciais osmóticos (ψ_s) de 0,0; -0,089; -0,178; e -0,267, calculados de acordo com a equação de J.H. Van't Hoff, citada por Salisbury e Ross (1992):

$$\psi = -i \cdot C \cdot R \cdot T$$

Onde:

ψ = potencial osmótico (MPa);

i = coeficiente isotônico ou constante de dissociação ($i_{\text{NaCl}} = 1,8$);

C = concentração da solução (mol por litro de H_2O : 0,0; 20, 40 e 60 mM);

R = constante universal dos gases ($0,00831 \text{ MPa L K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$);

T = temperatura (K).

No total foram realizadas quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento.

O esquema abaixo mostra a montagem experimental/tratamentos:

ESQUEMA EXPERIMENTAL

Ácido Salicílico (AS)			
0,0 mM de AS 0,0 mM de NaCl	0,0 mM de AS 20 mM de NaCl	0,0 mM de AS 40 mM de NaCl	0,0 mM de AS 60 mM de NaCl
0,5 mM de AS 0,0 mM de NaCl	0,5 mM de AS 20 mM de NaCl	0,5 mM de AS 40 mM de NaCl	0,5 mM de AS 60 mM de NaCl

Espermidina (Spd)			
0,0 mM de Spd 0,0 mM de NaCl	0,0 mM de Spd 20 mM de NaCl	0,0 mM de Spd 40 mM de NaCl	0,0 mM de Spd 60 mM de NaCl
0,5 mM de Spd 0,0 mM de NaCl	0,5 mM de Spd 20 mM de NaCl	0,5 mM de Spd 40 mM de NaCl	0,5 mM de Spd 60 mM de NaCl

3.3. Instalação do experimento

As sementes foram colocadas em caixa de acrílico transparente (11,0 x 11,0 x 3,5 cm), limpas com hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo), diluída em água a 5% (v/v) e, em seguida, borrifadas com álcool 70% (v/v) e secas ao ar sobre bancada, em temperatura ambiente. Os papéis mata-borrão, utilizados como substratos, foram envolvidos em folhas de alumínio flexível e esterilizados em autoclave a 120 °C por 40 minutos. As caixas foram revestidas com uma folha de papel mata-borrão e foi realizada a distribuição de 25 sementes por caixa, logo após foram umedecida todas as caixas com suas respectivas soluções na quantidade 2,5 vezes a massa do papel (BRASIL, 2009). Em seguida foram colocadas em

germinador FANEN Mod. 347 CDG na temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. A contagem das sementes germinadas foi realizada em intervalos de 24 horas até completar 10 dias após a semeadura. O critério de germinação seguiu Duran e Tortosa (1985) que consideram sementes germinadas as que apresentam extensão da raiz primária ≥ 2 mm e curvatura geotrópica positiva. Ao final do experimento foram coletadas amostras vegetais e armazenadas em freezer -80°C para análises bioquímicas.

3.5. Parâmetros bioquímicos e fisiológicos

3.5.1. Germinação

A germinação de sementes no 10º dia foi avaliada conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), considerando-se a porcentagem de sementes germinadas. O cálculo de porcentagem de germinação sob as condições de estresse salino, com e sem espermidina ou ácido salicílico, foi realizado conforme expressão descrita por Labouriau & Agudo (1987):

$$G = (N/A).100$$

Onde:

G = porcentagem de germinação;

N = número de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar.

3.5.2. Peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídios foi determinada pelo conteúdo do malondialdeído (MDA). Foi determinado pela estimativa do conteúdo de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguindo a método de Heath e Packer (1968). A concentração do equivalente de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do MDA (ϵ $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol MDA g}^{-1}$ de massa fresca.

3.5.3. Extração e análise das enzimas antioxidantes

Para a análise das enzimas antioxidantes, foi preparado um extrato enzimático bruto utilizado para determinação das enzimas SOD, CAT e APX. As amostras foram homogeneizadas (3:1 volume do tampão de extração para peso fresco do tecido), o tampão de extração era composto: Fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 1 mM, ditioneitol (DTT) a 3 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 4% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 g, durante 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado para a análise em triplicatas da atividade específica das enzimas superóxido desmutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) (GOMES JUNIOR et al., 2007).

3.5.3.1. Superóxido dismutase (SOD EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto em 1,45 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 63 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 1,3 µM. A reação foi conduzida a 25°C em câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A atividade da enzima foi expressa em Unidade SOD mg⁻¹ proteína.

3.5.3.2. Catalase (CAT EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada segundo Kraus, Pauls e Fletcher (1995) e modificado por Azevedo et al. (1998). A reação se iniciou pela adição de 25 µL do extrato enzimático bruto a 1 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 e 25 µL H₂O₂. A atividade enzimática foi calculada e o resultado expresso em µmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína.

3.5.3.3. Ascorbato peroxidase (APX EC 1.11.1.11)

A atividade APX foi determinada seguindo-se a decomposição de peróxido de hidrogênio por 1 minuto, por alterações na absorbância a 290 nm segundo Moldes et

al. (2008), determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto em 950 μL de um meio de reação. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 80 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 1 mM e H_2O_2 1 mM. Os resultados foram expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína.

3.5.4 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada para os cálculos das atividades enzimáticas, a mesma foi realizada segundo Bradford (1976), utilizando-se curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA).

3.5.5. Teores de glicina betaína

Foi realizada a quantificação dos teores de glicina betaína de acordo com a metodologia Grieve e Grattan (1983). Para preparação do extrato foi adicionado em 20 mL de água deionizada 0,5 g de material seco e moído. Subsequentemente, os extratos permaneceram durante 24 horas sob agitação em temperatura de 25°C, após este período os extratos foram filtrados, com extrato pronto realizou a mistura na proporção de 1:1 com H_2SO_4 2N, em seguida foi retirado uma alíquota de 250 μL e foi mantido em água gelada durante 1 hora, após esse período foi adicionado 100 μL de KI-I_2 e agitou por 5 segundos, os mesmos foram fechados com papel filme para evitar a volatilização. Os tubos com os extratos foram mantidos à temperatura de 4°C durante 16 horas para terminar a reação. Em seguida os tubos foram centrifugados a 11.872 g por 15 minutos a 0 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado permanecendo apenas os cristais de periodato, os quais foram dissolvidos em 4,5 mL de 1,2-dicloroetano. Após 2 horas e 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 365 nm no espectrofotômetro Beckman DU 640. Uma curva padrão de glicina betaína (50-200 $\mu\text{g/mL}$) foi preparada em H_2SO_4 1N. Os resultados foram expressos em mmol GB g^{-1} de massa seca.

3.5.6. Crescimento de plântulas

No 10º dia as plântulas desenvolvidas foram separadas em plúmulas e raízes e levadas em estufa de circulação forçada de ar em temperatura de 65 °C até apresentarem peso constante. Após resfriamento foram pesadas em balança

analítica Denver Instrument Company AA-200, com precisão de 1×10^{-8} g. Os dados foram expressos em mg plântulas⁻¹.

3.6. Análise estatística

Para os dados de germinação foi realizada a normalização com a transformação dos dados em $\arcsen \sqrt{x/100}$ da distribuição dos desvios, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância por meio da aplicação do Teste F e na ocorrência de diferenças de ordem significativa os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% probabilidade, utilizando o software AgroEstat (BARBOSA; MALDONADO, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Germinação (G)

Na Figura 2 estão apresentados os dados referentes ao desdobramento da interação entre as espécies, os compostos (Spd e AS) e as concentrações salinas para a porcentagem de sementes germinadas (%). A aplicação exógena de Spd reduziu em 2,8% a PSG no guandu, enquanto que a PSG no labe-labe não foi afetada (Figura 2A). Com o desdobramento da interação do estresse salino e espécies estudadas observou-se que o estresse salino não alterou o comportamento das espécies, porém quando se observaram as espécies isoladamente, constatou-se que houve uma redução na PSG no guandu de 6,2; 7,3 e 3,3% nas respectivas concentrações de 20, 40 e 60 mM de NaCl em relação ao controle, o que não ocorreu no Labe-labe (Figura 2B). De acordo com o desdobramento da interação entre salinidade e os compostos, o AS atenuou os efeitos do estresse salino somente nas sementes dentro da concentração mais moderada de NaCl (20 mM), elevando a germinação em 4,3%. Entre as concentrações de NaCl tanto o AS como a Spd tiveram um efeito negativo significativo em relação ao controle; para o AS a redução foi de 4,7 e 4,15%, em 40 e 60 mM de NaCl; já para Spd, a redução foi de 2,6 e 3,7%, respectivamente nas concentrações de 20, 40 mM de NaCl (Figura 2C).

Os resultados encontrados nos indicam que o uso da Spd e do AS, possuem um efeito negativo sobre o processo germinativo com aumento das concentrações salinas, esse comportamento pode ser explicado em razão dos mesmos ocasionarem o aumento dos níveis de ácido abscísico e diminuição dos níveis de giberelinas (RIVAS-SAN VICENTE; PLASENCIA, 2011; SAHA et al., 2015). Resultado semelhante a este trabalho foi encontrado por Melloni et al. (2012), em que estes autores, estudando o fornecimento de Spd exógena em sementes de leguminosas forrageiras (guandu cv. Caqui, alfafa cv. Crioula e labe-labe cv. Rongai), encontraram uma redução com o incremento da salinidade. Por outro lado, Szepesi et al. (2005) utilizando AS em estresse salino, observaram aumento na porcentagem de germinação de sementes de tomate. Essa divergência pode ser explicada em razão das espécies se comportarem de maneira diferente às concentrações dos compostos estudados.

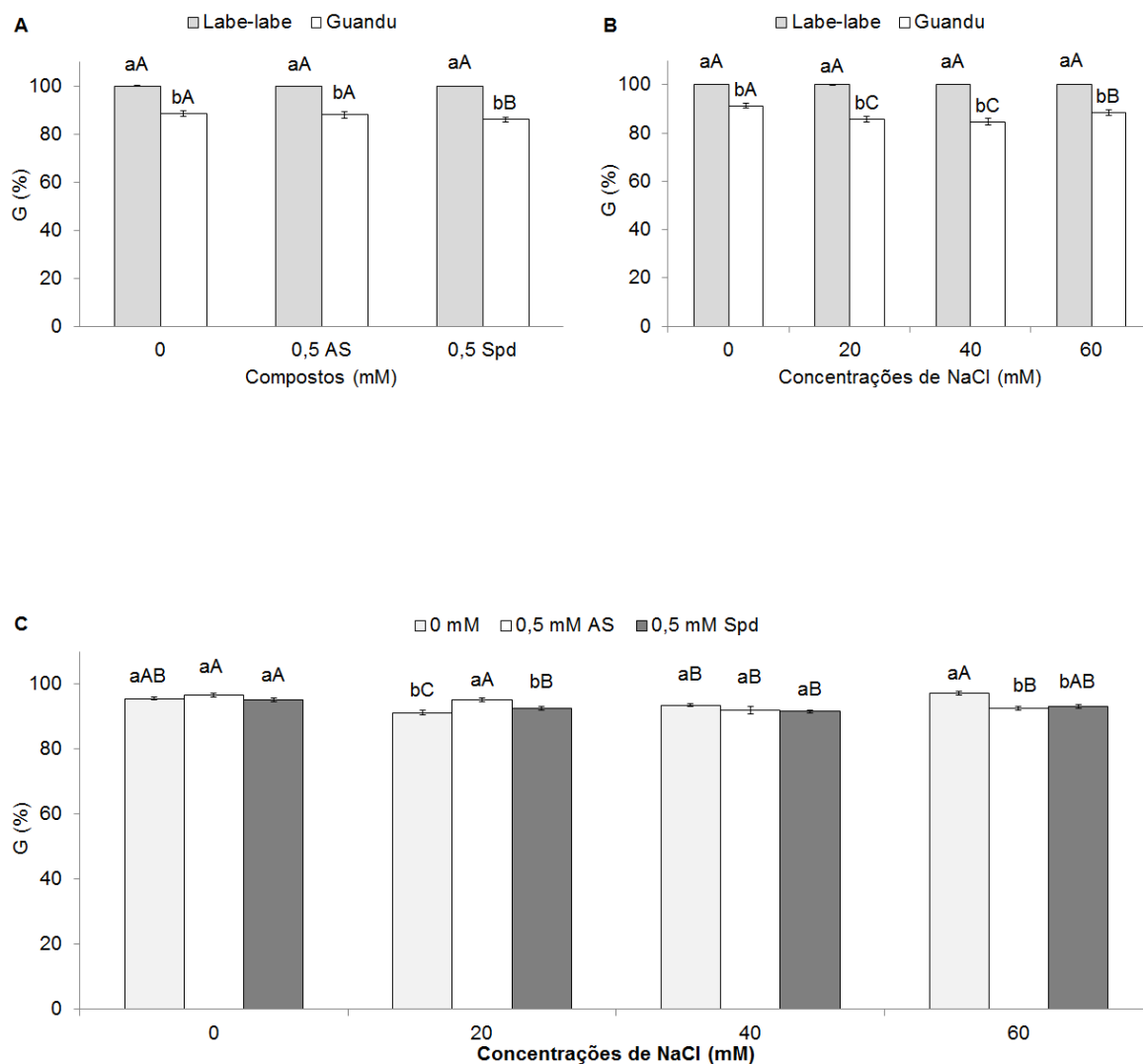


Figura 2. Valores médios da germinação (G) de guandu cv. BRS Mandarin e Labe-labe cv. Rongai aos 10 dias da semeadura. **A.** Efeito do ácido salicílico (AS) e da poliamina espermidina (Spd). **B.** Efeito das concentrações de NaCl. **C.** Interação dos compostos (As e Spd) e salinidade (NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (dentro das concentrações) e maiúscula (entre as concentrações) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias de quatro repetições.

4.3. Peroxidação de lipídios

Na Figura 3 encontra-se o malondialdeído (MDA), que é utilizado como indicador de peroxidação de lipídios. Essa é uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a peroxidação de lipídios, o malondialdeído que é um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão beta dos AGPIs peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. O MDA é volátil e possui baixo peso molecular ($C_3H_4O_2$ PM=71,07) (LIMA; ABDALLA, 2001). Entretanto, é considerado como um marcador bioquímico de estresse oxidativo (SHULAEV; OLIVER, 2006).

Na Figura 3A o uso da Spd apresentou uma redução significativa do MDA em 21,7% no labe-labe. Na interação do estresse salino e as espécies, o MDA apresentou uma redução de 12,3; 21 e 25,1% no labe-labe nas concentrações 20, 40 e 60 mM de NaCl e 23,6% no guandu, na concentração de 60 mM de NaCl em relação ao controle (Figura 3B). Na interação do estresse salino e os compostos, o AS proporcionou diminuição de 15,6; 29 e 27,9% em 20, 40 e 60 mM de NaCl respectivamente. Dentro das concentrações salinas, o uso da Spd proporcionou decréscimo da concentração de MDA em 26,5 e 21% em 0 e 20 mM de NaCl. Nas concentrações mais elevadas de 40 e 60 mM de NaCl os compostos não apresentaram diferença significativa para a concentração de MDA (Figura 3C).

Comparando os hormônios vegetais, a Spd proporciona melhor resposta em relação ao AS dentro das concentrações salinas. Isso ocorreu devido a Spd ter incrementado a atividade das enzimas antioxidantes, ocorrendo, assim, diminuição da peroxidação lipídica. Os efeitos positivos desses hormônios na atenuação do estresse oxidativo foram registrados em vários estudos, onde autores relatam o decréscimo na concentração de malondialdeído (TARI et al., 2002; POPOVA et al., 2003). O efeito do AS foi descrito por Dolatabadian et al. (2009), que constatou diminuição do MDA quando as plantas de trigos foram tratadas com o AS.

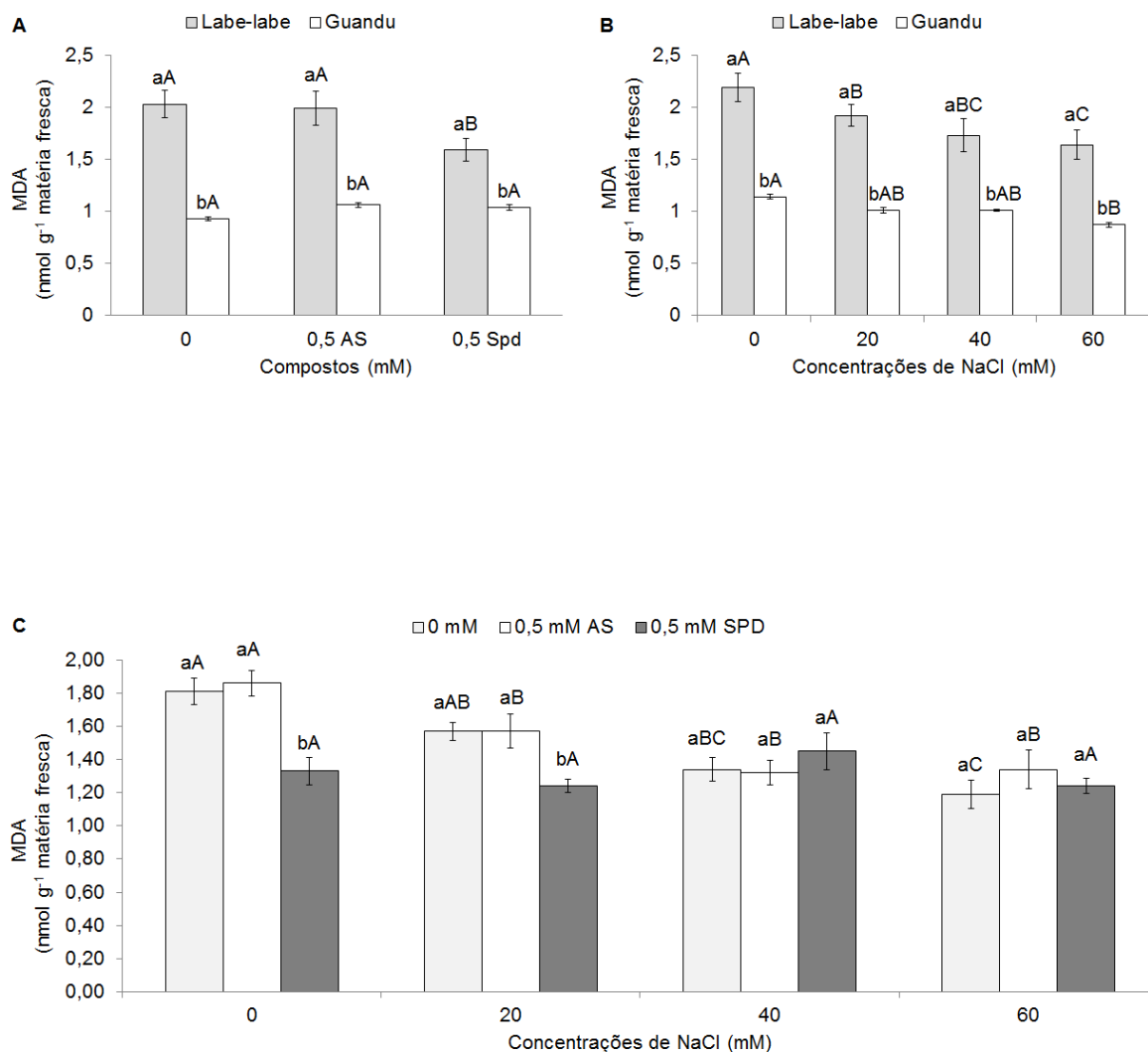


Figura 3. Valores médios da concentração de malondialdeído (MDA) presente em guandu cv. BRS Mandarin e Labe-labe cv. Rongai aos 10 dias da semeadura. **A.** Efeito do ácido salicílico (AS) e da poliamina espermidina (Spd). **B.** Efeito das concentrações de NaCl. **C.** Interação dos compostos (As e Spd) e salinidade (NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (dentro das concentrações) e maiúscula (entre as concentrações) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias de quatro repetições, realizadas em triplicatas.

4.2. Enzimas antioxidantes

4.2.1. Superóxido dismutase (SOD)

Na Figura 4 encontra-se a atividade da SOD. Dentre as enzimas responsáveis pela eliminação das espécies reativas de oxigênio, a SOD é considerada chave, pois é a primeira linha de defesa ao estresse oxidativo, a mesma realiza a dismutação do radical O_2^- a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ASADA, 1999; SILVA et al., 2014).

O uso do AS diminuiu a atividade da SOD, sendo essa redução no labe-labe de 18,4% em relação ao controle; no guandu a redução observada foi de 6,4% com AS (Figura 4A). O estresse salino diminuiu a atividade da SOD no labe-labe em 4,2% na concentração de 60 mM de NaCl e no guandu, por outro lado, promoveu o aumento da atividade da enzima em 17,3 e 24,4% nas concentrações de 40 e 60 mM de NaCl (Figura 4B). A interação do estresse salino e os compostos, indica que o uso do AS aumenta a atividade da SOD em 9,1% na concentração de 60 mM. Dentro das concentrações salinas observou uma resposta positiva na atividade da enzima de 20,1% na presença da Spd em condições de estresse salino de 20 mM de NaCl (Figura 4C).

O uso da Spd aumenta a atividade da SOD em níveis leves de estresse, indicando que em altas concentrações salinas a mesma não apresentou um efeito protetor. O AS proporcionou um aumento na atividade SOD no estresse mais severo, ao contrario do que foi encontrado neste trabalho Dolatabadian et al. (2009) relata efeito inibitório, ao estudar o efeito do AS no estresse salino em sementes de trigo. A resposta encontrada no trabalho evidencia o uso do AS na proteção da plântula quando submetida a estresse salino, em condições adversas, mantendo uma relação positiva direta na medida em que há o aumento dos níveis de estresse.

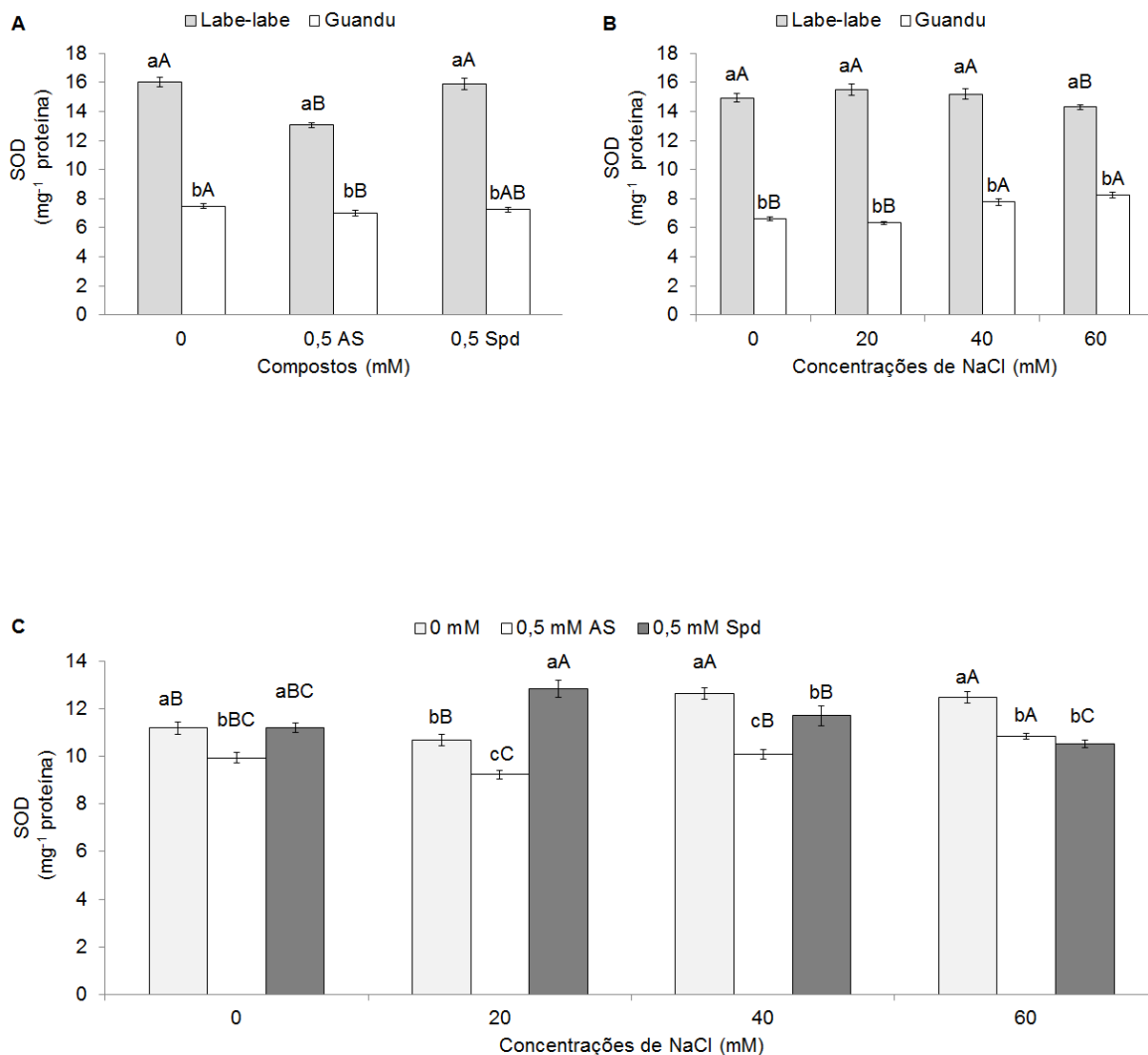


Figura 4. Valores médios da atividade específica da superóxido dismutase (SOD) presente em guandu cv. BRS Mandarin e Labe-labe cv. Rongai aos 10 dias da semeadura. **A.** Efeito do ácido salicílico (AS) e da poliamina espermidina (Spd). **B.** Efeito das concentrações de NaCl. **C.** Interação dos compostos (AS e Spd) e salinidade (NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (dentro das concentrações) e maiúscula (entre as concentrações) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias de quatro repetições, realizadas em triplicatas.

4.2.2. Catalase (CAT)

A atividade da CAT (Figura 5) pode variar em função da intensidade do estresse. Embora a SOD seja a primeira linha de defesa ao estresse oxidativo, seu produto, o H_2O_2 , deve ser rapidamente eliminado com enzimas subsequentes do sistema antioxidante, como a CAT e APX (WILLEKENS et al., 1995).

No labe-labe, houve diferença entre as médias da atividade da CAT, com aumentos relacionados com o uso de Spd na atividade da CAT de 51,6% em relação ao controle; por outro lado, em guandu, a atividade dessa enzima foi reduzida em 20,7% (com AS) e em 13,4% (com Spd) (Figura 5A). No estresse salino observou-se diferença significativa no guandu, onde nos estresses mais severos (40 e 60 mM de NaCl) obteve-se o aumento de 10,8 e 15,8%, respectivamente (Figura 5B).

Em relação à interação do estresse salino e os compostos (Figura 5C), a presença da Spd teve um resultado significativo, onde ocorreu aumento da atividade da CAT em 11,2; 9,7 e 9,9% (em 20, 40 e 60 mM de NaCl, respectivamente). Com o uso do AS o aumento foi de 28,3% (em 60 mM de NaCl). Dentre as concentrações, foi observado que a Spd teve resposta superior, proporcionando aumento acentuado na atividade da CAT em 107,2; 87,1; 91,6 e 66,3% nas respectivas concentrações salinas 0, 20, 40 e 60 mM de NaCl.

Deste modo o uso da Spd tem um efeito na atividade da CAT, ao estudar outro tipo de composto atenuador (óxido nítrico) do estresse oxidativo, Pires (2014), relatou o mesmo como agente protetor e sinalizador em sementes de gergelim submetidas a diferentes potenciais osmóticos.

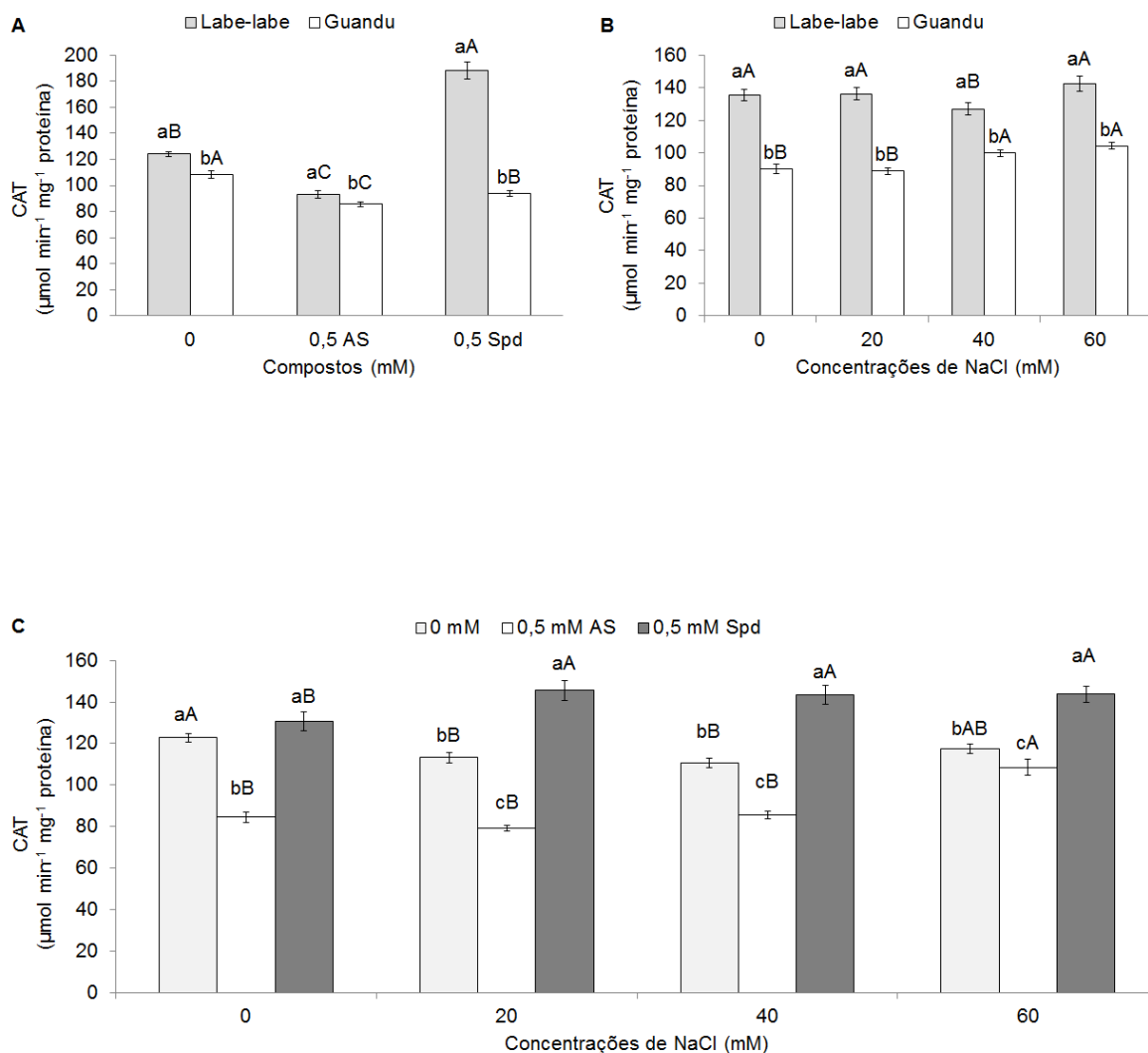


Figura 5. Valores médios da atividade específica da catalase (CAT) presente em guandu cv. BRS Mandarin e Labe-labe cv. Rongai aos 10 dias da semeadura. **A.** Efeito do ácido salicílico (AS) e da poliamina espermidina (Spd). **B.** Efeito das concentrações de NaCl. **C.** Interação dos compostos (AS e Spd) e salinidade (NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (dentro das concentrações) e maiúscula (entre as concentrações) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias de quatro repetições, realizadas em triplicatas.

4.2.3. Ascorbato peroxidase (APX)

Na Figura 6 encontra-se a atividade da APX. O aumento na atividade da CAT e APX, em condições de estresse pode ser justificado pela necessidade de remoção do H_2O_2 produzido pela atividade da SOD e também pela possível taxa de fotorrespiração ocorrida nas plantas estressadas (CARNEIRO et al., 2011).

O uso da Spd aumentou a atividade da APX, no labe-labe em 20,9% (Figura 6A). Na interação do estresse salino com as espécies há aumento na atividade da APX. Verifica-se que no labe-labe esse aumento foi de 14,3; 14,4 e 9,2% nas concentrações de 20, 40 e 60 mM, já para o guandu o aumento observado foi de 13,3 e 27,1% nas concentrações de 40 e 60 mM de NaCl respectivamente (Figura 6B). Na interação entre salinidade e os compostos, entre os níveis de NaCl, o AS proporcionou aumento da atividade da APX de 17,1% em 60 mM de NaCl; o uso da Spd dentro das concentrações teve um efeito positivo na atividade da enzima de 32,8; 39,5 e 8,5% em 0, 20 e 40 mM de NaCl (Figura 6C).

O aumento da atividade da APX devido ao estresse salino é um indicativo de que a mesma é responsiva ao estresse oxidativo, a Spd apresenta uma influência positiva no aumento da APX em níveis leves a moderados de NaCl. Resposta semelhante foi descrito por Carneiro et al. (2011), estudando o mecanismo de defesa para estresse oxidativo em plântulas de girassol submetidas aos agentes osmóticos PEG 6000 e NaCl, em que obtiveram incremento na atividade da APX nos potenciais hídricos menos severos.

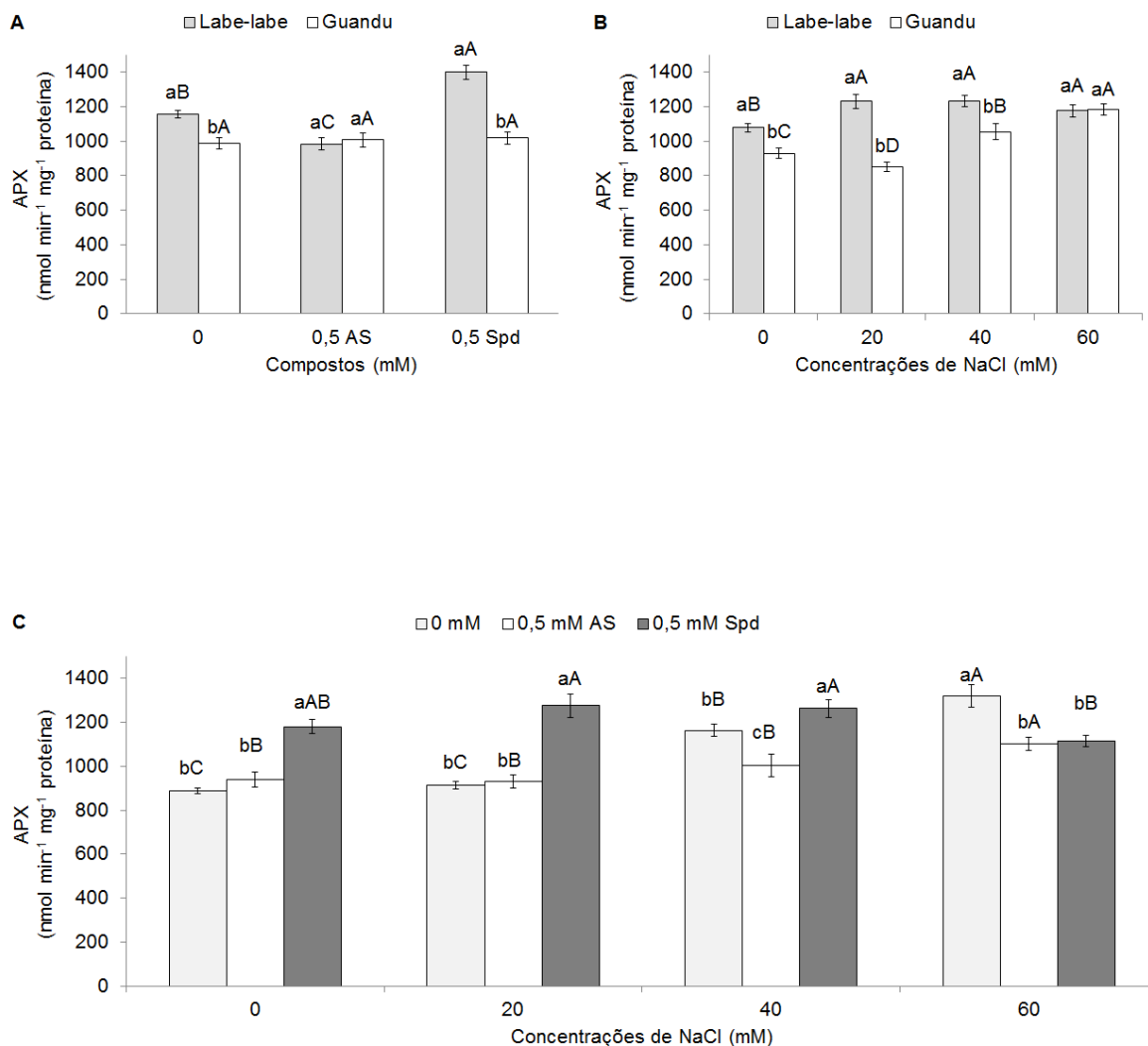


Figura 6. Valores médios da atividade específica da ascorbato peroxidase (APX) presente em guandu cv. BRS Mandarin e Labe-labe cv. Rongai aos 10 dias da semeadura. **A.** Efeito do ácido salicílico (AS) e da poliamina espermidina (Spd). **B.** Efeito das concentrações de NaCl. **C.** Interação dos compostos (As e Spd) e salinidade (NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (dentro das concentrações) e maiúscula (entre as concentrações) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias de quatro repetições, realizadas em triplicatas.

4.4. Teores de glicina betaína (GB)

Na Figura 7 encontra-se os teores de GB. No labe-labe observou decréscimo nos teores de GB de 17,4% com uso do AS e de 26,2% com uso da Spd; no guandu apenas a Spd proporcionou decréscimo de 4,2% em relação ao controle (Figuras 7A). Para a interação do estresse salino e as espécies, observou-se que os teores de GB diminuíram em 11; 12,1 e 8,1% no labe-labe e de 19,9; 28,9 e 50,4% no guandu nas concentrações salinas de 20, 40 e 60 mM de NaCl (Figura 7B).

Para a interação do estresse salino e os compostos, o AS entre as concentrações salinas reduziu os teores de GB em 23,6; 25 e 32,6%; a Spd reduziu os teores de GB em 20; 28,9 e 41% em relação ao controle. Dentro das concentrações salinas, o AS proporcionou redução dos teores de GB em 17,2; 12,1 e 6,9% nos níveis salinos de 20, 40 e 60 mM de NaCl; a Spd reduziu os teores de GB em 2,2; 17,6; 20,9 e 22,6% nas concentrações de 0, 20, 40 e 60 mM de NaCl (Figura 7C).

O decréscimo observado com a utilização dos compostos no leva a resposta que os mesmos atenuaram os efeitos do estresse salino, corroborando que ambos compostos desempenham função na tolerância ao estresse estudado. Além disso, a aplicação de poliaminas podem manter a integridade celular das raízes sob estresse salino (ZHAO; QIN, 2004; ASHRAF et al., 2008).

O resultado encontrado neste trabalho, foi relatado por Cha-Um, Supaibulwatana e Kirdmanee (2006), em plantas de arroz sob estresse salino, destacando que esta cultura possui baixíssima capacidade para acumular glicina betaína atuando com baixa intensidade na osmoproteção celular aos sais.

Por outro Khan, Asgher e Khan (2014), relataram efeito positivo do ácido salicílico no acúmulo da glicina betaína, relacionam essa resposta devido ao aumento da metionina.

Isto pode nos indicar que as espécies estudadas podem não possuir a característica de serem acumuladoras deste osmoprotetor ou que planta evitou o gasto energético para a produção do mesmo.

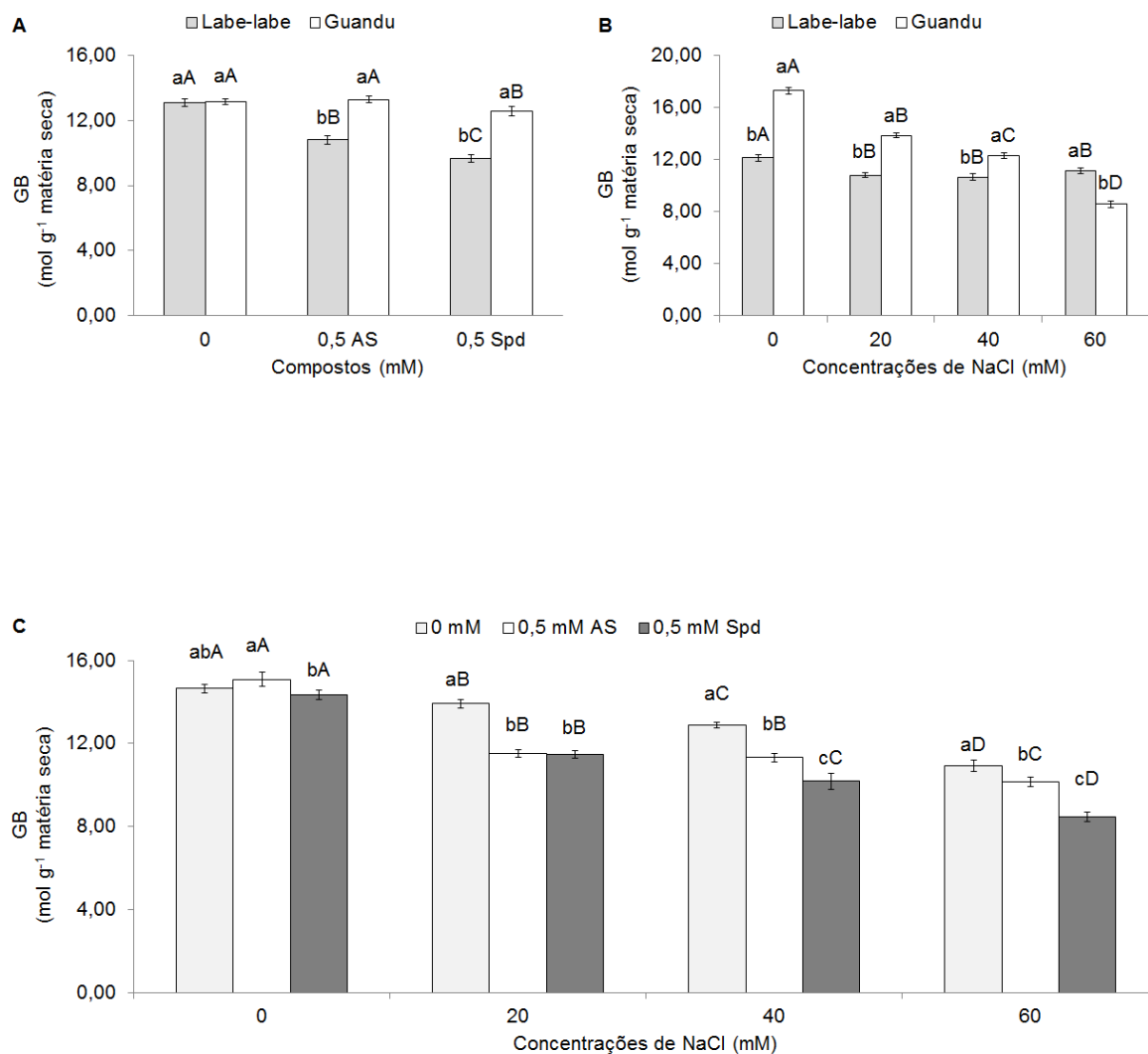


Figura 7. Valores médios dos teores de glicina betaína (GB) presente em guandu cv. BRS Mandarin e Labe-labe cv. Rongai aos 10 dias da semeadura. **A.** Efeito do ácido salicílico (AS) e da poliamina espermidina (Spd). **B.** Efeito das concentrações de NaCl. **C.** Interação dos compostos (AS e Spd) e salinidade (NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (dentro das concentrações) e maiúscula (entre as concentrações) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias de quatro repetições, realizadas em triplicatas.

4.5. Crescimento de plântulas

Na Figura 8 e 9 encontra-se o comportamento da MSP e MSR. Constatou-se que os compostos aumentaram e a MSP e MSR no labe-labe, com aumentos respectivos de 12,3 e 12,1% na presença do AS, enquanto que a Spd proporcionou aumentos mais expressivos, cerca de 23% em MSP e MSR. Estes resultados, tomados em conjunto, evidenciam a resposta positiva no crescimento do labe-labe em função do uso dos compostos. Em contraste, em guandu, a MSP não foi afetada pelos compostos, observando-se, diferença apenas na MSR, evidenciada por uma redução de cerca de 12% no crescimento com o uso do AS, em relação ao tratamento-controle (Figuras 8A e 9A).

O estresse salino, não afetou a MSP nas espécies estudadas, porém em MSR houve uma diminuição significativa em ambas as espécies, particularmente na concentração mais elevada (60 mM) de NaCl, sendo que a redução foi de 12,8% no labe-labe e de 42,8% no guandu em relação aos maiores valores de MSR encontrados (Figura 8B e 9B). Na interação do estresse salino e os compostos, a MSP foi afetada tanto pelo AS como pela Spd; dentro das concentrações de NaCl, os compostos atenuaram os efeitos do estresse até nas concentrações mais elevadas, observando-se aumentos (sob 60 mM de NaCl) de MSP de 27,6 e 41,2%, respectivamente com o uso de AS (Figura 8C).

Entretanto, os efeitos positivos dos compostos na MSR foram observados apenas na concentração mais moderada de NaCl (20 mM): AS proporcionou um aumento de 24% e a Spd um aumento de 30,6%. Na concentração de 60 mM de NaCl, a Spd resultou em redução de 8% em MSR em relação ao tratamento-controle (Figura 9C).

O presente resultado encontrado, sugere o efeito atenuador dos compostos na MSP sob estresse salino, ressaltando-se que, para a raiz, tais efeitos foram encontrados apenas na concentração de 20 mM de NaCl. Isso pode estar relacionado ao fato de a raiz estar mais próxima da solução salina, o que potencializaria os danos neste órgão. Resultado contrastante aos observados no presente estudo foi encontrado por Monteiro et al. (2014), em que a utilização de outra poliamina, a putrescina, foi capaz de atenuar os efeitos da salinidade na

redução do crescimento das raízes, embora esse efeito tenha sido menos evidente na parte aérea.

Para a diminuição dos danos causados pelo estresse salino, podemos relacionar que o sistema antioxidante enzimático foi fundamental para aumentar a tolerância das plântulas ao estresse. Quando os compostos aumentaram a atividade das enzimas e conseqüentemente diminuíram os níveis de MDA e H_2O_2 , proporcionando o crescimento das plântulas mesmo em estresse.

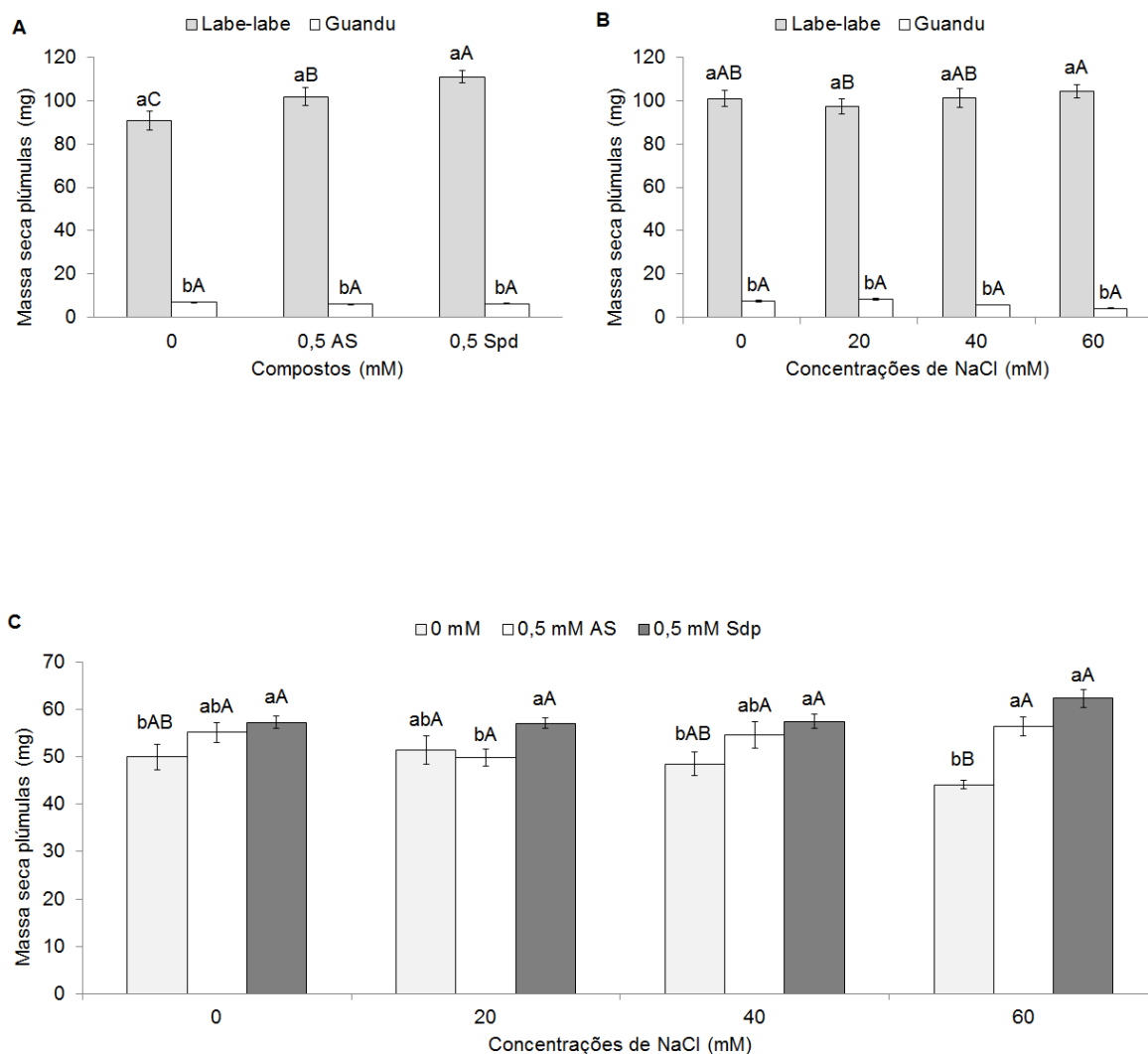


Figura 8. Valores médios da massa seca de plúmulas (MSP) de guandu cv. BRS Mandarin e Labe-labe cv. Rongai aos 10 dias da semeadura. **A.** Efeito do ácido salicílico (AS) e da poliamina espermidina (Spd). **B.** Efeito das concentrações de NaCl. **C.** Interação dos compostos (As e Spd) e salinidade (NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (dentro das concentrações) e maiúscula (entre as concentrações) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias de quatro repetições.

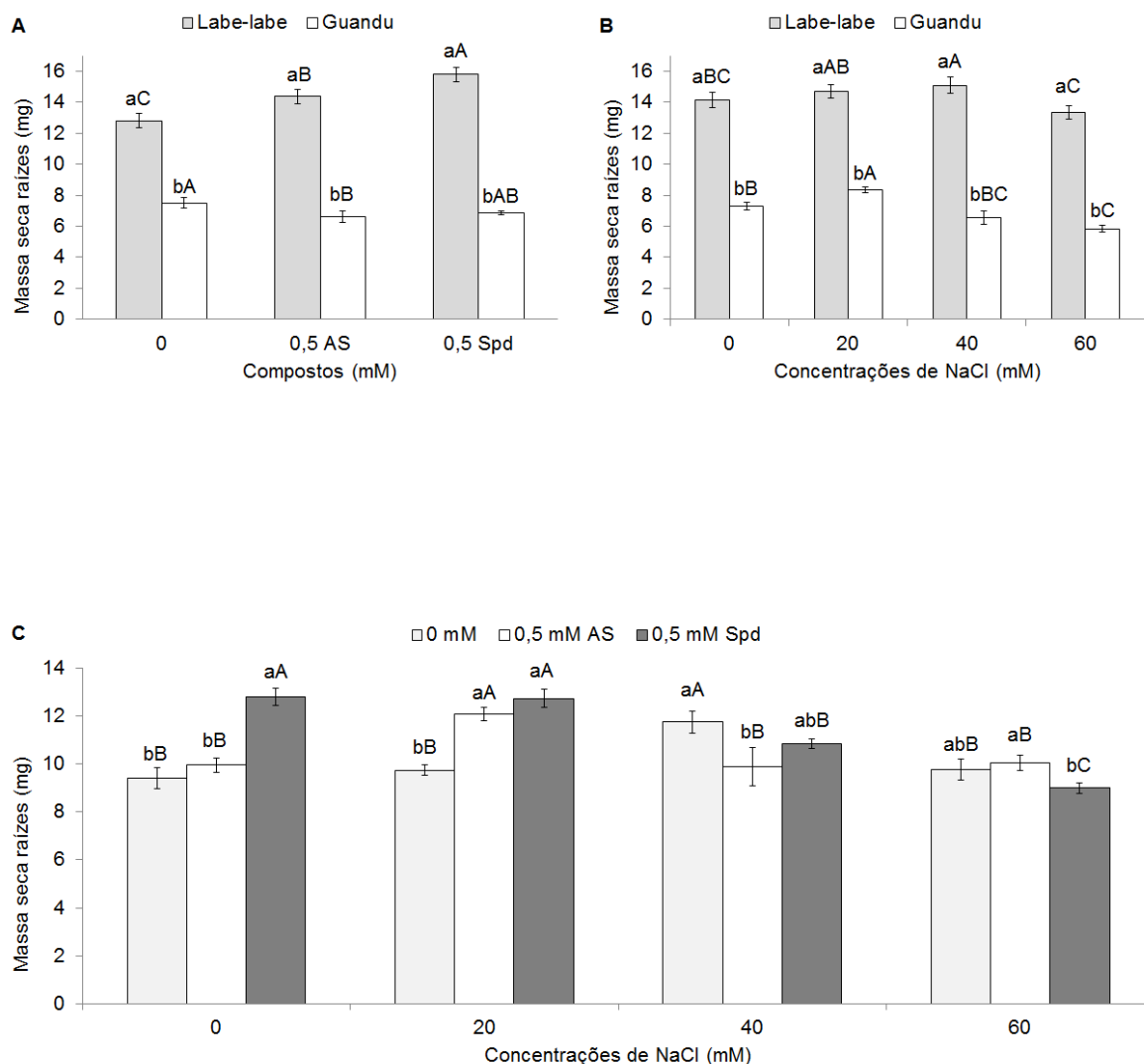


Figura 9. Valores médios da massa seca de raízes (MSR) de guandu cv. BRS Mandarin e Labe-labe cv. Rongai aos 10 dias da sementeira. **A.** Efeito do ácido salicílico (AS) e da poliamina espermidina (Spd). **B.** Efeito das concentrações de NaCl. **C.** Interação dos compostos (AS e Spd) e salinidade (NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (dentro das concentrações) e maiúscula (entre as concentrações) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias de quatro repetições.

5. CONCLUSÕES

Nas plantas sob salinidade, a Spd e o AS aumentaram o crescimento da parte aérea das espécies, mas diminuíram a germinação e o crescimento de raízes nas plântulas.

A Spd aumentou a atividade da CAT, enquanto que o AS aumentou a atividade da SOD e da APX, nas plântulas sob estresse salino.

O uso do AS e da Spd ocasionaram no decréscimo de glicina betaína.

O labe-labe é menos sensível ao estresse salino estudado que o guandu.

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, M. S. A.; ALI, Q.; ASHRAF, M.; HAIDER, M. Z.; ABBAS, Q. Involvement of polyamines, abscisic acid and anti-oxidative enzymes in adaptation of Blue Panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.) to saline environments. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, n. 3, p. 409-417, 2009.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 601-639, 1999.

ASHRAF, M.; ATHAR, H. R.; HARRIS, P. J. C.; KWON, T. R. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. **Advances in agronomy**, San Diego, v. 97, p. 45-110, 2008.

AZEVEDO NETO, A. D.; da SILVA, E. C.; CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B. Physiology and biochemistry of salt stress tolerance in plants. **Abiotic Stresses in Crop Plants**, Oxfordshire, p. 81, 2015.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

AZEVEDO, R. L.; RIBEIRO, G. T.; AZEVEDO, C. L. L. Feijão guandu: uma planta multiuso. **Revista da Fapese**, Aracaju, v.3, n.2, p. 81-86, 2007.

AZIZ, A.; BRUN, O.; AUDRAN, J. C. Involvement of polyamines in the control of fruitlet physiological abscission in grapevine (*Vitis vinifera*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.113, n.1, p.50-58, 2001.

BANDYOPADHYAY, U.; BANERJEE, D. R. K. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. **Current Science**, Calcutta, v. 77, n.1, p. 658-666, 1999.

Barbosa, J. C.; Maldonado Júnior, W. **Experimentação Agronômica & AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agronômicos**. Funep, Jaboticabal, SP, Brazil, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília: Mapa/ACS, 399 p. 2009.

BROWN, J. D.; DAY, A. M.; TAYLOR, S. R.; TOMALIN, L. E.; MORGAN, B. A.; VEAL, E. A. A peroxiredoxin promotes H₂O₂ signaling and oxidative stress resistance by oxidizing a thioredoxin family protein. **Cell reports**, Berlin v. 5, n. 5, p. 1425-1435, 2013.

CALEGARI, A.; MONDARDO, A.; BULISANI, E. A; WILDNER, L. P.; COSTA, M. B. B.; ALCÂNTARA, P. B.; MIYASAKA, S.; AMADO, T. J. C. **Adubação verde no Sul do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: ASPTA, 1993. 346 p.

CARNEIRO, M. M. L. C.; DEUNER, S.; OLIVEIRA, P. O. D.; TEIXEIRA, S. B.; SOUSA, C. P.; BACARIN, M. A.; MORAES, D. M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 755-764, 2011.

CARVALHO, P. R.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Ácido salicílico em sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.) sob diferentes estresses. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina – PR, v. 29, n.1, p. 114-124, 2007.

CHATTOPADHAYAY, M. K.; GUPTA, S.; SENGUPTA, D. N.; GHOSH, B. Expression of arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.34, n. 1, p.477–483, 1997.

CHA-UM, S.; SUPAIBULWATANA, K.; KIRDMANEE, C. Water relation, photosynthetic ability and growth of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp. Indica Cv. KDML 105) to salt stress by application of exogenous glycinebetaine and choline. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Malden, v. 192, n. 1, p. 25-36, 2006.

CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D. F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, Oxford, v. 262, n. 5141, p. 1883-1886, 1993.

COELHO, D. L. M.; AGOSTINI, E. A. T. D.; GUABERTO, L. M.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 491-499, 2010.

DALBERTO, D. S.; BRAGA, L. F. Estresse osmótico e putrescina na germinação de sementes de *Ochroma pyramidale* (Cav. ExLam) Urb (*Malvaceae*). **Científica**, Jaboticabal, v. 41, n. 2, p. 99-110, 2013.

DANTAS, B. F.; RIBEIRO, R. S.; ARAGÃO, C. A. Germination, initial growth and cotyledon protein content of bean cultivars under salinity stress. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 106-110, 2007.

DOLATABADIAN, A.; MODARRES SANAVY, S. A. M.; SHARIFI, M. Effect of salicylic acid and salt on wheat seed germination. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil and Plant Science**, Copenhagen, v. 59, n. 5, p. 456-464, 2009.

DURAN, J. M.; TORTOSA, M. E. The effect of mechanical and chemical scarification on germination of charlock (*Sinapsis arvensis* L.) seeds. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 13, n. 1, p. 155-163, 1985.

FAGUNDES, J. L.; MOREIRA, A. L.; FREITAS, A. W. D. P.; FREITAS, A. W. D. P.; HENRICHES, R.; ROCH, F. C.; BACKES, A. A. Capacidade de suporte de pastagens de capim-tifton 85 adubado com nitrogênio manejadas em lotação contínua com ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.40, n.12, p.2651-2657, 2011.

FARIDUDDIN, Q.; VARSHNEY, P.; YUSUF, M.; AHMAD, A. Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. **Journal of Plant Interactions**, Londres, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2013.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; LEE, D. J. Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracóvia, v. 31, n. 5, p. 937-945, 2009.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, n. 1, p. 839–863, 2013.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GOMES-JUNIOR, R. A.; GRATÃO, P. L.; GAZIOLA, S. A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Vitória, v. 34, n. 5, p. 449-456, 2007.

GRIEVE, C. M.; GRATAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil**, Crawley, v. 70, n. 2, p. 303-307, 1983.

GUO, Q.; MENG, L.; MAO, P. C.; JIA, Y. Q.; SHI, Y. J. Role of exogenous salicylic acid in alleviating cadmium-induced toxicity in Kentucky bluegrass. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 269–276, 2013.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International Journal of Genomics**, Chichester, v. 2014, n. 1, p. 1–18, 2014.

GUPTA, K.; DEY, A.; GUPTA, B. Plant polyamines in abiotic stress responses. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracovia, v. 35, n. 1, p. 2015-2036, 2013.

HAMDIA, M. A.; SHADDAD, M. A. K. Salt tolerance of crop plants. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, Irkutsk, v. 6, n. 3, p. 64–90, 2010.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HORVÁTH, E.; SZALAI, G.; JANDA, T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York v. 26, n. 3, p. 290-300, 2007.

JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANEERSELVAM, R. Alterations in osmoregulations, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 150-157, 2007.

JAYAKANNAN, M.; BOSE, J.; BABOURINA, O.; RENGEL, Z.; SHABALA, S. Salicylic acid improves salinity tolerance in Arabidopsis by restoring membrane potential and preventing salt-induced K⁺ loss via a GORK channel. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 2255–2268, 2013.

KHAN, M. I. R.; ASGHER, M.; KHAN, N. A. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 67-74, 2014.

KHOURY, C. K.; CASTAÑEDA-ALVAREZ, N. P.; ACHICANOY, H. A.; SOSA, C. C.; BERNAU, V.; KASSA, M. T.; JARVIS, A. Crop wild relatives of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]: Distributions, ex situ conservation status, and potential genetic resources for abiotic stress tolerance. **Biological Conservation**, Essex, v. 184, p. 259-270, 2015.

KOTAKIS, C.; THEODOROPOULOU, E.; TASSIS, K.; OUSTAMANOLAKIS, C.; LOANNIDIS, N. E.; KOTZABASIS, K. Putrescine, a fast-acting switch for tolerance against osmotic stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 171, n. 2, p. 48-51, 2014.

KRAUS, T. E.; PAULS, K. P.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-and hardening-induced thermotolerance of wheat: are heat shock proteins involved?. **Plant and cell physiology**, Kyoto, v. 36, n. 1, p. 59-67, 1995.

LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. II. Light-temperature interactions: preliminary results. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 1/2, p. 57-69, 1987.

LAKZAYI, M.; SABBAGH, E.; RIGI, K.; KESHTEHGAR, A. Effect of salicylic acid on activities of antioxidant enzymes, flowering and fruit yield and the role on reduce of drought stress. **International Journal Farming & Allied Sciences**, Pexauar, v. 3 n. 9, p. 980-987, 2014.

LICHTENTHALER, H.K. El estrés y la medida del estrés en plantas. In: REIGOSA, M.J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. (Ed). **La Ecofisiología Vegetal –Una ciencia de síntesis**. Madrid. 2004.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.37, n. 3, p. 294-303, 2001.

MAASS, B. L.; KNOX, M. R.; VENKATESHA, S. C.; ANGESSA, T. T.; RAMME, S.; PENGELLY, B. C. Lablab purpureus—a crop lost for Africa?. **Tropical plant biology**, v. 3, n. 3, p. 123-135, 2010.

MANSOUR, M. M. F. The plasma membrane transport systems and adaptation to salinity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 171, n. 18, p. 1787-1800, 2014.

MELLONI, M. L. G.; CRUZ, F. J. R.; SANTOS, D. M. M. D.; SOUZA, L. F. G. D.; SILVA, J. D.; SACCINI, V. A. V.; MONTEIRO, J. G. Espermidina exógena atenua os efeitos do NaCl na germinação e crescimento inicial de leguminosas forrageiras. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 495-503, 2012.

MENEZES, L. A. S.; LEANDRO, W. M.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, J. P.; DE BARCELLOS FERREIRA, A. C.; DAS GRAÇAS SANTANA, J.; BARROS, R. G. Produção de fitomassa de diferentes espécies, isoladas e consorciadas, com potencial de utilização para cobertura do solo. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 1, 2009.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, Amsterdam, v. 9, p. 490-498, 2004.

MOLDES, C. A.; MEDICI, L. O.; ABRAHÃO, O. S.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracóvia, v. 30, n. 4, p. 469-479, 2008.

MOLLER, I. M.; SWEETLOVE, L. J. ROS signalling—specificity is required. **Trends in plant science**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 370-374, 2010.

MONTEIRO, J. G.; CRUZ, F. J. R.; NARDIN, M. B.; SANTOS, D. M. M. D. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, 49, n.1, p.18-25, jan. 2014

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review and Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 651-681, 2008.

MURPHY, A. M.; COLUCCI, P. E. (1999). A tropical forage solution to poor quality ruminant diets: A review of *Lablab purpureus*. **Livestock Research for Rural Development**, v. 11, n. 2, p. 16, 1999.

NOREEN, S.; ADHRAF, M. Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid: growth and photosynthesis. **Pakistan Journal Botany**, Carachi, v. 40, n. 4, p. 1657-1663, 2008.

PÁL, M.; SZALAI, G.; JANDA, T. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. **Plant Science**, Oxford, v. 237, p. 16-23, 2015.

PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; BOHNERT, H. J.; GOVINDJEE, H. J. **Abiotic stress adaptation in plants: physiological, molecular and genomic foundation**. Springer, Dordrecht. 1^a ed. 2010. 526 p.

PINHEIRO, G. G.; ZANOTTI, R. F.; PAIVA, C. E. C.; LOPEZ, C.; GAI, Z. T. Efeito do estresse salino em sementes e plântulas de feijão-guandu. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 901-912, 2013.

PIRES, R. M. D. O. **Ação protetora do óxido nítrico em sementes de gergelim (*sesamum indicum* L.) submetidas a diferentes condições de estresse**. 2014, 70 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

POPOVA, L.; ANANIEVA, E.; HRISTOVA, V.; CHRISTOV, K.; GEORGIEVA, K.; ALEXIEVA, V.; STOINOVA, Z. H. Salicylic acid-and methyl jasmonate-induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 133, n. 1, p. 133-152, 2003.

RIVAS-SAN VICENTE, M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 62, n. 10, p. 3321-3338, 2011.

RYTER, S. W.; TYRREL, R. M. Singlet molecular oxygen: a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 24, p. 1520-1534, 1998.

SAHA, J.; BRAUER, E. K.; SENGUPTA, A.; POPESCU, S. C.; GUPTA, K.; GUPTA, B. Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v. 3, n. 1, p. 21, 2015.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Fisiologia do estresse. In: _____ (Ed.). **Fisiologia das plantas**. São Paulo: Cengage Learning, 2012. p. 616-651.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Photosynthesis: environmental and agricultural aspects. **Plant physiology**. Wadsworth Publishing Company, Belmont, v. 286, n. 1, p. 249-265, 1992.

SHARMA, D. K.; DUBEY, A. K.; SRIVASTAV, M.; SINGH, A. K.; SAIRAM, R. K.; PANDEY, R. N.; DAHUJA, A.; KAUR, C. Effect of putrescine and paclobutrazol on growth, physiochemical parameters, and nutrient acquisition of salt-sensitive citrus rootstock karna khatta (*Citrus karna* Raf.) under NaCl stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, n. 3, p. 301-311, 2011.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, New York, v. 2012, 2012.

SHULAEV, V.; OLIVER, D. J. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. new tools for reactive oxygen species research. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 141, n. 2, p. 367-372, 2006.

SILVA, A. R. F. D. **Componentes de produção e fisiológicos em ecótipos de *Vigna* sob reposição hídrica**. 2014. 84p. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, Campina Grande, 2014.

SILVA, G. M.; DA SILVA, F. F.; VIANA, P. T.; DE OLIVEIRA RODRIGUES, E. S.; MOREIRA, C. N.; DE ALMEIDA MENESES, M.; DA SILVA BARRETO, L. Avaliação de forrageiras tropicais: Revisão. **Pubvet**, Londrina, v. 10, n. 3, 2016.

SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 161-180.

STRID, A.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. **Photosynthesis Research**, The Hague, v. 39, p. 475-489, 1994.

SZEPESI, A.; CSISZÁR, J.; BAJKÁN, S.; GÉMES, K.; HORVÁTH, F.; ERDEI, L.; TARI, I. Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt-and osmotic stress. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 49, n. 1-2, p. 123-125, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAMÁS, L.; ŠIMONOVÍČOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I. Aluminium stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 51, n. 2, p. 281-288, 2004.

TANG, X.; MU, X.; SHAO, H.; WANG, H.; BRESTIC, M. Global plant-responding mechanisms to salt stress: physiological and molecular levels and implications in biotechnology. **Critical reviews in biotechnology**, Boca Raton, v. 35, n. 4, p. 425-437, 2015.

TARI, I.; CSISZÁR, J.; SZALAI, G.; HORVÁTH, F.; PÉCSVÁRADI, A.; KISS, G.; ERDEI, L. Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 46, n. 3-4, p. 55-56, 2002.

TASSONI, A.; FRANCESCHETTI, M.; BAGNI, N. Polyamines and salt stress response and tolerance in *Arabidopsis thaliana* flowers. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, n. 5, p. 607-613, 2008.

WAKEEL, A. Potassium-sodium interactions in soil and plant under saline-sodic conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, n. 3, p. 344-354, 2013.

WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 207-228, 1995.

YASAR, F.; ELLIALTIOGLU, S.; YILDIZ, K. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation and chlorophyll content in green bean. **Russian Journal Plant Physiology**, New York, v. 55, n. 6, p. 782-786, 2008.

ZEID, I. M. Response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to exogenous putrescine treatment under salinity stress. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Pakistan, v.7, n.2, p.219-225, 2004

ZHAO, F. G.; QIN, P. Protective effect of exogenous polyamines on root tonoplast function against salt stress in barley seedlings. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 42, n. 2, p. 97-103, 2004.

APÊNDICE

Apêndice A. Análise de variância dos seguintes parâmetros germinação (G), malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glicina betaína (GB), massa seca de plúmulas (MSP) e massa seca de raízes (MSR).

F.V	G.L.	Quadrados médios							
		G (%)	MDA (nmol g ⁻¹ matéria fresca)	SOD (mg ⁻¹ proteína)	CAT (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)	APX (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)	GB (mol g ⁻¹ matéria seca)	MSP (mg)	MSR (mg)
Espécies (E)	1	3762.51**	17.90**	1437.94**	37404.93**	743540.16**	80,10**	213967.05**	1283.42**
Compostos (C)	2	14.51*	0.37**	28.50**	211172.17**	374548.15**	31,67**	824.79**	11.71**
NaCl (S)	3	52.95**	0.72**	2.49**	650.09**	166043.64**	97,65**	12.47 ^{NS}	15.01**
E x C	2	12.51*	0.63**	17.13**	18415.48**	329025.29**	19,01**	928.45**	27.09**
E x S	3	54.17**	0.13*	10.43**	505.35**	151990.89**	63,74**	131.79**	5.34**
A x C	6	26.12**	0.22**	8.01**	653.8**	135343.89**	4,20**	90.58*	14.57**
E x C x S	6	27.67**	0.28**	11.83**	1510.91**	222410.84**	4,72**	69.44*	4.96**
Resíduo	72	3.01	0.04	0.3064	50.25	5428.4	0,242	30,32	0,72
CV(%):		1.85	14,29	4,98	6,14	6,75	4,07	10,26	7,95

**significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F, *significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F, G.L = grau de liberdade; F.V = fonte de variação.