

BETACYANIN AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN TOLERANCE TO SALT STRESS IN *Alternanthera philoxeroides*

BETACIANINAS Y EL SISTEMA DE ANTIOXIDANTES EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO DE *Alternanthera philoxeroides*

Márcia Vaz **Ribeiro**, Sidnei **Deuner**, Letícia Carvalho **Benitez**,
Andersom Milech **Einhardt**, José A. **Peters**, Eugenia J. Bolacel **Braga**

Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Universitário s/n, Caixa Postal 354-96010-900. Capão do Leão - RS, Brasil (jacirabraga@hotmail.com)

ABSTRACT

Salinity is a limiting factor for growth and development, since it affects several physiological processes in plants. This trial aimed to assess the levels of photosynthetic pigments, betacyanins, lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in *Alternanthera philoxeroides* under salt stress. Plants originated from an *in vitro* culture were acclimatized and irrigated with sodium chloride (0, 200 and 400 mM) for 30 d. The experimental design was completely randomized with a 3×2 factorial arrangement of treatments: three concentrations of NaCl and two plant tissues (stems and leaves). The experimental data was subjected to an analysis of variance and means were compared using Tukey test ($p \leq 0.05$). The levels of chlorophylls *a*, chlorophylls *b* and total carotenoids presented similar responses, decreasing their values according to salt concentrations, while the chlorophyll *a/b* ratio of the plants that were submitted to the highest salt concentration presented a significant increase when compared to the control. Higher levels of betacyanin were observed on stems, when compared to the leaves, in the highest salt concentrations. On the leaves, there was a significant increase of lipid peroxidation and superoxide dismutase activity, whereas roots showed an increase of the enzymes catalase and ascorbate peroxidase. Salt stress caused greater degradation in the photosynthetic pigments, increment of betacyanin synthesis in stems, and damage to the cell membranes of the leaves. However, the increase of antioxidant enzymes activity stimulated the protective system against oxidative stress. It is concluded that *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. plants present reduction in levels of photosynthetic pigments, increased synthesis of betacyanins and increased activity of

RESUMEN

La salinidad es un factor limitante para el crecimiento y el desarrollo, ya que afecta varios procesos fisiológicos en las plantas. Este estudio tuvo el objetivo de evaluar los niveles de pigmentos fotosintéticos, betacianinas, peroxidación lipídica y actividad de enzimas antioxidantes en *Alternanthera philoxeroides* bajo estrés salino. Las plantas se originaron de un cultivo *in vitro* y se aclimataron e irrigaron con cloruro de sodio (0, 200 y 400 mM) durante 30 d. El diseño experimental fue completamente aleatorio con un arreglo factorial 3×2 de los tratamientos: tres concentraciones de NaCl y dos tejidos vegetales (tallos y hojas). Los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza y las medias se compararon usando la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los niveles de clorofilas *a*, clorofilas *b* y carotenoides totales presentaron respuestas similares, disminuyeron sus valores con las concentraciones de sal, mientras que la relación de clorofila *a/b* de las plantas que se expusieron a la concentración mayor de sal presentó un incremento significativo respecto al control. Niveles mayores de betacianinas se observaron en los tallos, en comparación con las hojas, para las concentraciones de sal más altas. En las hojas hubo un aumento significativo de peroxidación lipídica y de actividad de superóxido dismutasa, mientras que las raíces mostraron un aumento en las enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa. El estrés salino causó degradación mayor de los pigmentos fotosintéticos, un aumento en la síntesis de betacianinas en los tallos, y daño a las membranas celulares de las hojas. Sin embargo, el incremento de actividad de las enzimas antioxidantes estimuló el sistema protector contra el estrés oxidativo. Se concluye que las plantas de *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. presentan una reducción en los niveles de pigmentos fotosintéticos, mayor síntesis de betacianinas y mayor actividad de enzimas antioxidantes en las hojas y raíces cuando están expuestas a estrés salino.

*Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: April, 2013. Approved: February, 2014.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 48: 199-210. 2014.

antioxidant enzymes in leaves and roots when exposed to salt stress.

Key words: Amaranthaceae, alligator weed, sodium chloride, photosynthetic pigments, antioxidant enzymes.

INTRODUCTION

Salinity is one of the most important factors among abiotic stress limiting plant growth and yield, because it affects almost all physiological and biochemical processes, reducing the yield (Flowers, 2004). High salt concentrations induce water stress (hydric deficit), causing cellular and ionic imbalance, due to the toxicity of these ions, and promoting osmotic stress (Mandhania *et al.*, 2006; Khan and Panda, 2008). Specific effects of salt stress on plants' metabolism have been linked to the accumulation of toxic ions such as Na^+ and Cl^- (Khan and Panda, 2008) and to the depletion of K^+ and Ca^{2+} (Sumithra *et al.*, 2006). The primary consequence of salt stress is ionic imbalance and cellular hyperosmotic stress, whereas the secondary consequence is the increased production of reactive oxygen species (ROS) (Panda and Khan, 2009): superoxide radicals ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\text{OH}^\bullet$) and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$).

Plants, in order to protect their cell membranes and organelles from the damaging effects of these radicals, activate an antioxidant defense system consisting of superoxide dismutase (SOD-EC 1.15.1.1), catalase (CAT-EC 1.11.1.6) and ascorbate peroxidase (APX-EC 1.11.1.1) that efficiently reduce ROS under normal circumstances. But if the complete reduction does not occur under conditions of increased production, the result can be a state of stress leading to oxidation of lipids, proteins and DNA. These events can trigger inactivation of cellular components, accelerating the process of cell death (Buckner *et al.*, 2000). In this sense, the antioxidant defense system plays a key role towards the acquisition of tolerance. Leaf pigments such as chlorophylls and carotenoids can also be used as indicative parameters of stress, when plants are cultivated under high salt concentrations. Depending on the species under study, cultivar, exposure time and salt concentration, such stress may affect the absorption of nutrients that constitute

Palabras clave: Amaranthaceae, hierba de caimán, cloruro de sodio, pigmentos fotosintéticos, enzimas antioxidantes.

INTRODUCCIÓN

La salinidad es uno de los factores más importantes del estrés abiótico que limita el crecimiento y el rendimiento de las plantas, porque afecta casi todos los procesos fisiológicos y bioquímicos, reduciendo el rendimiento (Flowers, 2004). Concentraciones altas de sal inducen estrés hídrico (déficit hídrico), causan desequilibrio celular e iónico, por la toxicidad de estos iones, y promueven estrés osmótico (Mandhania *et al.*, 2006; Khan y Panda, 2008). Los efectos específicos del estrés salino en el metabolismo de las plantas se han vinculado a la acumulación de iones tóxicos como Na^+ y Cl^- (Khan y Panda, 2008) y al agotamiento de K^+ y Ca^{2+} (Sumithra *et al.*, 2006). La principal consecuencia del estrés salino es el desequilibrio iónico y el estrés celular hiperosmótico, mientras que la consecuencia secundaria es un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Panda y Khan, 2009): radicales superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).

Las plantas, para proteger sus membrana celular y de sus organelos de los efectos dañinos de estos radicales, activan un sistema de protección antioxidante que consiste de superóxido dismutasa (SOD-EC 1.15.1.1), catalasa (CAT-EC 1.11.1.6) y ascorbato peroxidasa (APX-EC 1.11.1.1) que reducen eficientemente las ROS bajo circunstancias normales. No obstante, si la reducción completa no ocurre en condiciones de producción mayor, el resultado puede ser un estado de estrés que lleva a la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. Estos eventos pueden desencadenar la desactivación de componentes celulares, acelerando el proceso de muerte celular (Buckner *et al.*, 2000). En este sentido, el sistema de protección antioxidante tiene una función clave para la adquisición de la tolerancia. Los pigmentos de las hojas, como clorofilas y carotenoides, también pueden usarse como parámetros indicativos de estrés, cuando las plantas se cultivan con concentraciones altas de sal. Dependiendo de la especie en estudio, la variedad, el tiempo de exposición y la concentración de sal, este estrés puede afectar la absorción de nutrientes que constituyen la molécula de clorofila y la formación

the chlorophyll molecule and the formation of other photosynthetic pigments, therefore hampering photosynthesis itself (Santos, 2004).

The species *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb., which belongs to the Amaranthaceae family is known as alligator-weed. These plants are composed of flavonoids, saponins and betalains; betalains are natural N-heterocyclic pigments soluble in water that is divided into two structural groups: the betaxanthins (yellow) and betacyanins (red to red purple). Betacyanins are widely used as an additive to food and drugs, being a nontoxic natural dye (Azeredo, 2009; Volp *et al.*, 2009; Perotti *et al.*, 2010). Moreover, betalains play important roles in stress physiology, acting as ROS (resultant from abiotic stresses) detoxifiers, as it was observed in *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004) and abiotic stresses induced by UV radiation on *Mesembryanthemum crystallinum* (Vogt *et al.*, 1999). Native to South America this species is mainly found in pioneer formations, “restingas”, usually in recent sandy terrains (Blum, 2008). It is classified as a perennial species that grows abundantly in different ecosystems, from aquatic environments to those extremely dry, such as dunes (Gao *et al.*, 2007).

Given the above, this study aimed to investigate the effect of salinity on chlorophyll contents, total carotenoids, betacyanins, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in plants of *A. philoxeroides* in order to obtain information about the biochemical mechanisms that allow it to grow and develop in salty environments.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in the Laboratory of Tissue Culture Plants at the Universidade Federal de Pelotas, Brazil, in 2011. *A. philoxeroides* plants cultivated *in vitro* were taken to a greenhouse and acclimatized in expanded polystyrene trays containing washed sand as substrate. The plants were kept 10 d in a moist chamber with irrigation (microsprinkler); then plants were removed from the humid chamber and transferred to plastic pots (2 L capacity) containing the same substrate and maintained in a greenhouse. The plants received 100 mL of Hoagland complete nutritive solution (Hoagland and Arnon, 1938) every two days during 10 d; afterwards the application of 100 mL of NaCl per pot was initiated, at concentrations of 0, 200 and 400 mM, at intervals of four consecutive days, interspersed with water,

de otros pigmentos fotosintéticos, inhibiendo así la fotosíntesis (Santos, 2004).

La especie *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb., que pertenece a la familia Amaranthaceae, se conoce como hierba de caimán. Estas plantas contienen flavonoides, saponinas y betalainas; las betalainas son pigmentos naturales, N-heterocíclicos y solubles en agua que se dividen en dos grupos estructurales: las betaxantinas (amarillas) y las betacianinas (rojas a púrpuras). Las betacianinas son utilizadas ampliamente como aditivo para alimentos y medicamentos, y son un colorante natural no tóxico (Azeredo, 2009; Volp *et al.*, 2009; Perotti *et al.*, 2010). Además, las betalainas tienen funciones importantes en la fisiología del estrés, ya que actúan como desintoxicantes de ROS (que resultan del estrés abiótico), como se observó en *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004), y en el estrés abiótico inducido por radiación UV en *Mesembryanthemum crystallinum* (Vogt *et al.*, 1999). Nativa de Sudamérica, esta especie se encuentra principalmente en formaciones colonizadoras, “restingas”, usualmente en terrenos arenosos recientes (Blum, 2008). Se clasifica como una especie perenne que crece abundantemente en ecosistemas distintos, desde ambientes acuáticos hasta los extremadamente secos, como dunas (Gao *et al.*, 2007).

Por lo anterior, este estudio tuvo el objetivo de investigar el efecto de la salinidad en los contenidos de clorofila, carotenoides totales, betacianinas, peroxidación lipídica y enzimas antioxidantes en plantas de *A. philoxeroides*, para obtener información acerca de los mecanismos bioquímicos que le permiten crecer y desarrollarse en ambientes salinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en la Universidade Federal de Pelotas, Brasil, en 2011. Las plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro* se llevaron a un invernadero y se aclimataron en charolas de poliestireno expandido que contenían arena lavada como sustrato. Las plantas se mantuvieron durante 10 d en una cámara húmeda con irrigación (microaspersor); después, las plantas se sacaron de la cámara húmeda y se transfirieron a macetas de plástico (capacidad de 2 L) que contenían el mismo sustrato, y se conservaron en un invernadero. Las plantas recibieron 100 mL de solución nutritiva completa de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938) cada dos días durante 10 d; después, se comenzó con la aplicación de

during 30 d and then leaves, stems and roots were collected for biochemical analyses.

The photosynthetic pigments were extracted by maceration of leaves (approximately 200 mg) in acetone 80 %. The chlorophylls (Chl a , Chl b and total - Chl t) and carotenoids were evaluated using the method described by Lichtenthaler (1987) with some modifications. From the values obtained for the chlorophylls, the ratio of chlorophyll a/b was calculated. To quantify betacyanin, approximately 200 mg of leaves and stems were macerated in 5 mL of distilled water followed by centrifugation at 13 632 g (4 °C) for 25 min, following the methods described by Cai *et al.* (1998). Betacyanin values were expressed as a function of the amarantine content.

Lipid peroxidation was determined by quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) as described by Buege and Aust (1978). Two hundred milligrams of foliar and root tissue were macerated in liquid N $_2$ adding 20 % polyvinylpyrrolidone (PVPP) and homogenized in trichloroacetic acid (TCA) 0.1 % (w/v). The homogenate was centrifuged at 10 000 g for 10 min and an aliquot of 250 μ L of the supernatant was added to 1 mL of the reaction medium composed of thiobarbituric acid (TBA) 0.5 % (w/v) and trichloroacetic acid (TCA) 10 % (w/v). The mixture was then incubated in a water bath at 95 °C for 30 min. The reaction was stopped using rapid cooling on ice and the readings carried out in a spectrophotometer at 535 nm and 600 nm. The concentration of the complex Malonaldehyde (MDA)/thiobarbituric acid reactive species (TBARS) was calculated using the extinction coefficient of 1.55 mM $^{-1}$ cm $^{-1}$.

The activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) was determined in leaves and roots. The leaves used for this analysis were formed after the onset of the induction treatment. Thus, approximately 400 mg of fresh tissue (leaves and roots) were soaked and macerated in liquid N $_2$ added of 20 % PVPP and homogenized in 1.5 mL of extraction buffer containing 100 mM potassium phosphate (pH 7.0), 0.1 mM EDTA and 10 mM ascorbic acid. The homogenate was centrifuged at 13 000 g for 10 min at 4 °C and the supernatant collected for enzyme activity measurement.

The SOD activity was assessed by the ability of the enzyme to inhibit the photo-reduction of the nitroblue tetrazolium (NBT) (Giannopolitis and Ries, 1977) in a reaction medium comprising 100 mM potassium phosphate (pH 7.8), 14 mM methionine, 0.1 μ M EDTA, 75 μ M NBT and 2 μ M riboflavin. Readings were taken at 560 nm, and one unit of SOD was considered to be the amount of enzyme capable of inhibiting by 50 % NBT photo-reduction under the tested conditions. CAT activity was determined according to the protocol described by

100 mL de NaCl por maceta, con concentraciones de 0, 200 y 400 mM, en intervalos de cuatro días, intercalados con agua, durante 30 d y después se recolectaron hojas, tallos y raíces para su análisis bioquímico.

Los pigmentos fotosintéticos se extrajeron al macerar las hojas (aproximadamente 200 mg) en acetona al 80 %. Las clorofilas (Chl a , Chl b y total - Chl t) y los carotenoides se evaluaron con el método descrito por Lichtenthaler (1987), con algunas modificaciones. A partir de los valores obtenidos para las clorofilas, se calculó la relación de clorofila a/b . Para cuantificar las betacianinas, aproximadamente 200 mg de hojas y tallos se maceraron en 5 mL de agua destilada, y después se centrifugaron a 13 632 g (4 °C) por 25 min, con base en los métodos descritos por Cai *et al.* (1998). Los valores de betacianinas se expresaron como una función del contenido de amarantina.

La peroxidación lipídica se determinó por cuantificación de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) según lo descrito por Buege y Aust (1978). Doscientos miligramos de tejido de hojas y raíces se maceraron en N $_2$ líquido, añadiendo polivinilpirrolidona (PVPP) al 20 % y se homogenizaron en ácido tricloroacético (ATC) 0.1 % (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 10 000 g por 10 min y una alícuota de 250 μ L del sobrenadante se añadió a 1 mL del medio de reacción compuesto por ácido tiobarbitúrico (ATB) 0.5 % (p/v) y ácido tricloroacético (ATC) 10 % (p/v). Después la mezcla se incubó en baño María a 95 °C durante 30 min. La reacción se detuvo utilizando enfriamiento rápido en hielo y las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro a 535 nm y 600 nm. La concentración del complejo malonaldehído (MDA)/especies reactivas ácido tiobarbitúrico (TBARS) se calculó con el coeficiente de extinción de 1.55 mM $^{-1}$ cm $^{-1}$.

La actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) se determinó en hojas y raíces. Las hojas usadas para este análisis se formaron después del inicio del tratamiento de inducción. Por ende, aproximadamente 400 mg de tejido fresco (hojas y raíces) se remojaron y maceraron en N $_2$ líquido, con 20 % de PVPP, y homogeneizado en 1.5 mL de amortiguador de extracción que contenía fosfato de potasio 100 mM (pH 7.0), EDTA 0.1 mM y ácido ascórbico 10 mM. El homogeneizado se centrifugó a 13 000 g por 10 min a 4 °C y el sobrenadante se recolectó para la medición de la actividad de las enzimas.

La actividad de SOD se evaluó por la habilidad de la enzima para inhibir la fotoreducción del tetrazolio nitroazul (NBT) (Giannopolitis y Ries, 1977) en un medio de reacción constituido por fosfato de potasio 100 mM (pH 7.8), metionina 14 mM, EDTA 0.1 μ M, NBT 75 μ M y riboflavina 2 μ M. Las lecturas se hicieron a 560 nm y se consideró que una unidad de SOD era la cantidad de enzima capaz de inhibir 50 %

Azevedo *et al.* (1998) with some modifications. Its activity was monitored by the decrease in absorbance at 240 nm during 2 min in the reaction medium incubated at 28 °C, containing 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 12.5 mM H₂O₂. The plant extract was added prior to reading in the spectrophotometer. The APX activity was quantified following Nakano and Asada (1981), by monitoring the ascorbate oxidation rates at 290 nm during 2 min. The reaction medium incubated at 28 °C contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mM ascorbic acid and 0.1 mM H₂O₂, and also of the plant extracts added at the time of reading in the spectrophotometer.

The experimental design was completely randomized with a 3×2 factorial arrangement of treatments: three concentrations of NaCl and two plant tissues. For analyses of betacyanins the stem and leaf were used and for the enzymes analysis, roots and leaf. Leaves removed from each treatment (NaCl concentration) were used for the analyses of pigments. There were three repetitions and four plants per plot were the experimental unit. The experimental data was subjected to an analysis of variance and means were compared using Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

The contents of pigments showed significant differences between treatment (NaCl concentrations) and control (Table 1).

Salt stress significantly reduced the levels of chlorophyll; however, among the saline treatments (200 and 400 mM NaCl), no difference was found. This response indicates that in the presence of high salt concentration plants are unable to synthesis chlorophyll or alternatively that a greater degradation of such pigments occurs. Both chlorophyll *a* and *b* were reduced by NaCl, reflecting the highest ratio

de la fotorreducción de NBT en las condiciones de la prueba. La actividad de CAT se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Azevedo *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Su actividad se monitoreó con la disminución en absorbancia a 240 nm durante 2 min en el medio de reacción incubado a 28 °C, que contenía amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.0) y H₂O₂ 12.5 mM. El extracto vegetal se añadió antes de la lectura en espectrofotómetro. La actividad de APX se cuantificó con base en Nakano y Asada (1981), al monitorear las tasas de oxidación de ascorbato a 290 nm durante 2 min. El medio de reacción incubado a 28 °C contenía amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.0), ácido ascórbico 0.5 mM y H₂O₂ 0.1 mM, y también los extractos de planta añadidos al momento de la lectura en el espectrofotómetro.

El diseño experimental fue completamente aleatorio con un arreglo factorial 3×2 de los tratamientos: tres concentraciones de NaCl y dos tejidos vegetales. Para los análisis de betacianinas se utilizaron tallo y hoja, y para los análisis enzimáticos, raíz y hoja. Las hojas sacadas de cada tratamiento (concentración de NaCl) se utilizaron para el análisis de pigmentos. La unidad experimental fue de tres repeticiones y cuatro plantas por parcela. Los datos experimentales se evaluaron con un análisis de varianza y las medias se compararon usando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los contenidos de pigmentos mostraron diferencias significativas entre el tratamiento (concentraciones de NaCl) y el control (Cuadro 1).

El estrés salino redujo significativamente los niveles de clorofila; sin embargo, entre los tratamientos salinos (NaCl 200 y 400 mM), no se encontraron diferencias. Esta respuesta indica que en la presencia de concentraciones salinas altas las plantas no son capaces de sintetizar clorofila o, alternativamente, que una degradación mayor de esos pigmentos

Table 1. Contents of chlorophyll *a*, *b* and total, chlorophylls *a/b* ratio and total carotenoids in *Alternanthera philoxeroides* plants subjected to different concentration of NaCl for 30 days.

Cuadro 1. Contenidos de clorofila *a*, *b* y total, tasa clorofilas *a/b* y carotenoides totales en plantas de *Alternanthera philoxeroides* sujetas a distintas concentraciones de NaCl por 30 días.

NaCl (mM)	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g mg}^{-1}$ FW)	Chl <i>b</i> ($\mu\text{g mg}^{-1}$ FW)	Total Chl ($\mu\text{g mg}^{-1}$ FW)	Chl <i>a/b</i> ($\mu\text{g mg}^{-1}$ FW)	Carotenoids ($\mu\text{g mg}^{-1}$ FW)
0	0.921 a	0.341 a	1.262 a	2.700 b	0.251a
200	0.754 b	0.239 b	0.977 b	3.155 ab	0.201ab
400	0.700 b	0.199 b	0.836 b	3.517 a	0.180 b

Means with different letters in a column are significantly different ($p \leq 0.05$) ♦ Medias con distintas letras en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

of Chl *a/b* in the 400 mM NaCl treatment, which differed significantly from control. Salt stress also negatively affected the carotenoids content, with a significant reduction in the levels of these pigments in plants subjected to 400 mM NaCl when compared to control.

The plant's ability to grow and adapt to different environments is related to its reproductive efficiency, which is associated to the levels of chlorophyll. The content of chlorophylls in the leaves is used to estimate the photosynthetic potential of the plants, through its direct connection with the absorption and transfer of light energy and growth and adaptation to various environments (Almeida *et al.*, 2004). In plants, oxidative stress and signs of senescence include loss of chlorophyll, which lead to a progressive reduction in photosynthetic capacity (Thompson *et al.*, 1987). The smaller content of chlorophylls in plants subjected to salt stress can be explained by a decrease in its synthesis or higher degradation of these pigments, because during the process of degradation of chlorophyll Chl *b* is converted to the Chl *a* (Fang *et al.*, 1998), which may explain the increase in the ratio of Chl *a/b*, observed in this experiment. Panda and Khan (2009) also observed a reduction in chlorophyll and carotenoids in *Vigna radiata* plants after 24 h of salt stress. Santos (2004) noted that *Helianthus annuus* (L.) plants when exposed to salt stress displayed a strong inhibition of 5-aminolevulinic acid (ALA) synthesis, molecule precursor of chlorophyll. Besides, the enzyme chlorophyllase is stimulated to synthesize chlorophyll in the first days of moderate stress (Santos, 2004). However, such increased activity is strongly inhibited by high salt concentration.

Salt stress also leads to an increase of free radicals in the chloroplasts and consequently to the destruction of chlorophyll molecules, resulting in reduced photosynthetic ability and growth. Singlet oxygen atoms ($^1\text{O}_2$) and superoxide radicals ($\text{O}_2^{\bullet-}$) possess the ability to break the double bonds of unsaturated fatty acids and chlorophylls, thereby damaging the chloroplast membranes systems and photosynthetic reaction centers (Zhang *et al.*, 2003); this may result in the release of chlorophyll from the thylakoids. In this situation, the chlorophylls must be degraded as soon as possible to prevent cellular damage due to its photodynamic

ocurre. Tanto la clorofila *a* como la *b* se redujeron con el NaCl, reflejando la mayor tasa de Chl *a/b* en el tratamiento de NaCl 400 mM, lo cual difirió significativamente del control. El estrés salino también afectó negativamente el contenido de carotenoides, con una reducción significativa en los niveles de estos pigmentos en las plantas expuestas a NaCl 400 mM en comparación con el control.

La habilidad de la planta de crecer y adaptarse a distintos ambientes se relaciona con su eficiencia reproductiva, que está asociada con los niveles de clorofila. El contenido de clorofilas en las hojas se usa para estimar el potencial fotosintético de las plantas, a través de su conexión directa con la absorción y la transferencia de energía luminosa y su crecimiento y adaptación a diversos ambientes (Almeida *et al.*, 2004). En las plantas, el estrés oxidativo y los signos de senescencia incluyen la pérdida de clorofila, que lleva a la reducción progresiva de la capacidad fotosintética (Thompson *et al.*, 1987). Los contenidos menores de clorofilas en plantas expuestas a estrés salino pueden explicarse por una disminución en su síntesis o mayor degradación de los pigmentos, porque durante el proceso de degradación de clorofila la Chl *b* se convierte en Chl *a* (Fang *et al.*, 1998), lo que explica el aumento en la relación Chl *a/b* observada en este estudio. Panda y Khan (2009) también observaron reducción en clorofila y carotenoides en plantas de *Vigna radiata* después de 24 h de estrés salino. Santos (2004) notó que plantas de *Helianthus annuus* (L.) mostraron inhibición alta de la síntesis de 5-aminolevulinato (ALA), molécula precursora de la clorofila, al estar expuestas a estrés salino. Además, la enzima clorofilasa es estimulada para sintetizar clorofila en los primeros días de estrés moderado (Santos, 2004). Sin embargo, esta actividad mayor es fuertemente inhibida por una concentración alta de sal.

El estrés salino también lleva a un incremento de radicales libres en los cloroplastos y consecuentemente a la destrucción de moléculas de clorofila, resultando en actividad fotosintética menor y disminución del crecimiento. Los átomos de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y los radicales superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) poseen la habilidad de descomponer los enlaces dobles de los ácidos grasos insaturados y las clorofilas, así dañan los sistemas de membranas de cloroplastos y los centros de reacción fotosintéticos (Zhang *et al.*, 2003);

action (Takamiya *et al.*, 2000). If the chlorophyll degradation does not occur efficiently, it can be followed by an increase in the ROS production to an extent that the antioxidant system is no longer capable detoxify it, thus requiring the activation of other antioxidant systems (Dolatabadian *et al.*, 2008).

Carotenoids are pigments related to cell protection against photo-oxidative damage, especially the xanthophylls cycle (violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin) (García-Plazaola and Becerril, 1999; Mittler, 2002). In the present study the decrease in total carotenoids content agrees with the work performed by Pinheiro *et al.* (2006) in *Ricinus communis* (L.) plants, which also showed a reduction in the content of carotenoids by NaCl stress. Considering that the increase in the salt concentration was accompanied by decreases in the synthesis of chlorophylls and in the levels of total carotenoids, we suggest that *A. philoxeroides* plants possess a low capacity to absorb and transfer of light energy, as well as a thermal dissipation (in the form of heat) via the xanthophylls cycle. This loss of capacity for thermal dissipation associated with an accumulation of ATP and NADPH in the stroma, may result in the direct reaction of electrons arising from the photochemical phase of photosynthesis with molecular oxygen (O_2), resulting in a reversal of one of its spins, making it highly reactive (1O_2) (Pinheiro *et al.*, 2006).

In relation to betacyanins, there was a significant interaction between tissue and NaCl concentration, and the highest levels were observed in the stem (in relation to leaves) in all NaCl concentrations tested (Figure 1A). In leaves, no significant difference between treatments was found. However, in the stem, the increase in salt concentration induced a higher synthesis of betacyanins (increase of approximately 80 % in the treatment with 400 mM NaCl compared to control). These results indicate that the stem is the main tissue for the synthesis of the pigment, since in the leaves its contents were low and did not differ among the treatments. The increased synthesis of betacyanins observed in this study is consistent with the results obtained by Wang *et al.* (2008a) with *Suaeda salsa* plants, which belongs to the Chenopodiaceae family. These results suggest that the betacyanins may function as osmolytes in the defense of physiological processes

esto puede resultar en la liberación de clorofila de los tilacoides. En esta situación, las clorofilas deben ser degradadas tan pronto como sea posible para prevenir el daño celular a causa de su acción fotodinámica (Takamiya *et al.*, 2000). Si la degradación de clorofila no ocurre eficientemente, puede seguir un aumento en la producción de ROS al grado de que el sistema antioxidante ya no sea capaz de desintoxicar, requiriendo así la activación de otros sistemas antioxidantes (Dolatabadian *et al.*, 2008).

Los carotenoides son pigmentos relacionados con la protección celular contra el daño foto-oxidativo, especialmente el ciclo de las xantofilas (violaxantina, antheraxantina y zeaxantina) (García-Plazaola y Becerril, 1999; Mittler, 2002). En este estudio la disminución del contenido total de carotenoides coincidió con el trabajo realizado por Pinheiro *et al.* (2006) en plantas de *Ricinus communis* (L.), que también mostraron una reducción en el contenido de carotenoides con el estrés por NaCl. Considerando que el aumento en concentración de sal estuvo acompañado por decrementos en la síntesis de clorofilas y en los niveles de carotenoides totales, sugerimos que las plantas de *A. philoxeroides* poseen capacidad baja para absorber y transferir energía lumínica, así como para la disipación térmica (en forma de calor) vía el ciclo de xantofilas. Esta pérdida de capacidad para la disipación térmica asociada con una acumulación de ATP y NADPH en el estroma puede resultar en la reacción directa de electrones que surgen de la fase fotoquímica de la fotosíntesis con oxígeno molecular (O_2), produciendo el retorno de su spin, convirtiéndolo altamente reactivo (1O_2) (Pinheiro *et al.*, 2006).

En relación con las betacianinas, hubo una interacción significativa entre el tejido y la concentración de NaCl, y los niveles mayores se observaron en el tallo (en relación con las hojas) en todas las concentraciones de NaCl evaluadas (Figura 1A). En hojas, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos. Sin embargo, en el tallo el aumento de la concentración de sal indujo síntesis mayor de betacianinas (un aumento de aproximadamente 80 % en el tratamiento con NaCl 400 mM comparado con el testigo). Estos resultados indican que el tallo es el tejido principal de síntesis del pigmento, ya que en las hojas su contenido fue bajo y no difirió entre los tratamientos. La síntesis mayor de betacianinas

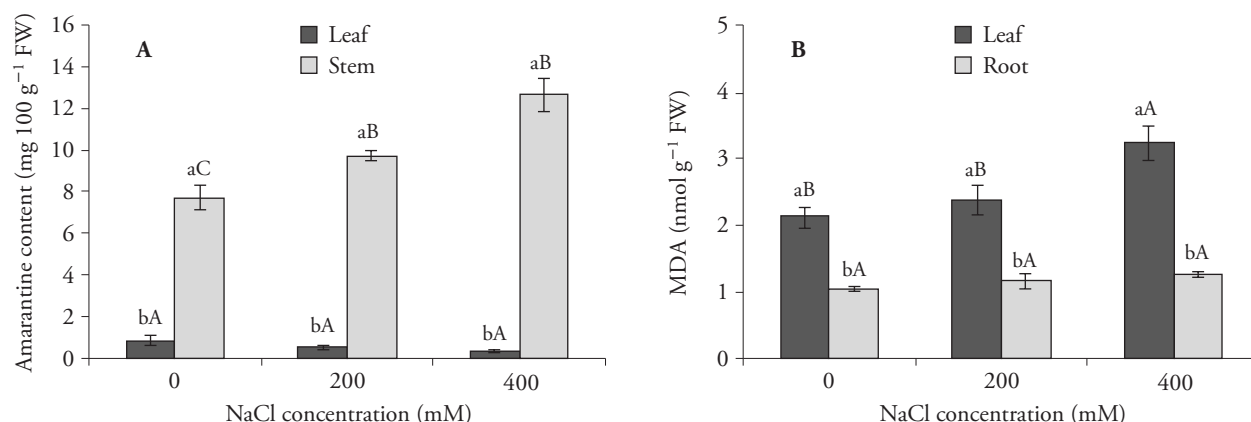


Figure 1. Levels of betacyanins (A) and lipid peroxidation (B) in plants of *Alternanthera philoxeroides* under different concentrations of NaCl for 30 days. Different letters indicate significant differences (Tukey post-hoc test; $p \leq 0.05$). Lowercase letters compare the different tissues within each concentration and capital letters compare the same tissues in different concentrations.

Figura 1. Niveles de betacianinas (A) y peroxidación lipídica (B) en plantas de *Alternanthera philoxeroides* bajo distintas concentraciones de NaCl durante 30 días. Distintas letras indican diferencias significativas (prueba de Tukey post-hoc; $p \leq 0.05$). Letras minúsculas comparan los distintos tejidos en cada concentración y letras mayúsculas comparan los mismos tejidos en distintas concentraciones.

against abiotic stress, by modulating the pool of amino acids.

As already mentioned, salt stress can lead to increased production of ROS, which can damage cell membranes due to lipid peroxidation. This behavior was evident in this study, with a significant interaction between tissue and NaCl concentration (Figure 1B). Thus, lipid peroxidation, represented by the increased production of malondialdehyde (MDA), to the leaves, was significantly higher in plants treated with 400 mM NaCl as compared to control (51.17 % increase). But in the roots there were no significant differences, indicating the greatest effect of stress on the shoots of *A. philoxeroides*. According to Savoure *et al.* (1999), the salt stress induces ions loss, and causes injuries that compromise the integrity of the membrane, which will be affected by ROS formed during photosynthesis or respiration. As lipid peroxidation is directly linked to oxidative stress, it is an indicative of increased stress (Hernandez *et al.*, 2000).

Salt stress also increases the H_2O_2 content, and therefore lipid peroxidation, by interrupting membrane permeability or inducing oxidative stress in plant tissues (Dolatabadian *et al.*, 2008; Panda and Khan, 2009; Deuner *et al.*, 2011a). Increased levels of H_2O_2 is related to the activity of SOD, the first enzyme acting in the antioxidant defense system

observada en este estudio es consistente con los resultados obtenidos por Wang *et al.* (2008a) con plantas de *Suaeda salsa*, de la familia Chenopodiaceae. Estos resultados sugieren que es posible que las betacianinas funcionen como osmolitos en la protección de los procesos fisiológicos contra el estrés abiótico, al modular la reserva de aminoácidos.

Como ya se mencionó, el estrés salino puede causar producción mayor de ROS, que puede dañar las membranas celulares debido a la peroxidación lipídica. Este comportamiento fue evidente en este estudio, con una interacción significativa entre el tejido y la concentración de NaCl (Figura 1B). Por lo tanto, la peroxidación lipídica, representada por la mayor producción de malondialdehído (MDA) por las hojas, fue significativamente mayor en plantas tratadas con NaCl 400 mM en comparación con el control (51.17 % de aumento). No obstante, en las raíces no hubo diferencias significativas, indicando el efecto mayor de estrés en los brotes de *A. philoxeroides*. Según Savoure *et al.* (1999), el estrés salino induce la pérdida de iones y causa daños que ponen en riesgo la integridad de la membrana, la cual será afectada por las ROS que se forman durante la fotosíntesis o la respiración. Dado que la peroxidación lipídica está directamente vinculada con el estrés oxidativo, es un indicador de mayor estrés (Hernandez *et al.*, 2000).

through dismutation of the $O_2^{\bullet-}$ radical to H_2O_2 (Sinha and Saxena, 2006). This compound must be eliminated in the sequence of enzymatic reactions by CAT and APX. Thus, as noted in the contents of betacyanin (Figure 1A) and lipid peroxidation (Figure 1B), *A. philoxeroides* also presents significant interaction between tissues and the salt concentrations tested for the SOD activity (Figure 2A). The highest level of stress (400 mM NaCl) increased activity of this enzyme in leaves and roots, compared to control (89.41 to 18.31 %). There was a significant difference between tissues, comparing control and 200 mM NaCl with higher values in the roots. This might justify its lower increase compared to leaves, since with 400 mM NaCl no differences were detected between tissues. For CAT there were no differences between treatments. Besides, in roots, the saline stress induced a higher activity of this enzyme, with a significant increase 75 % for 400 mM NaCl compared to the control (Figure 2B).

APX displayed similar behavior considering the saline treatments, *i.e.* did not differ in the leaves and

El estrés salino también aumenta el contenido de H_2O_2 , y por lo tanto la peroxidación lipídica, al interrumpir la permeabilidad de las membranas o inducir el estrés oxidativo en los tejidos vegetales (Dolatabadian *et al.*, 2008; Panda y Khan, 2009; Deuner *et al.*, 2011a). Niveles mayores de H_2O_2 se relacionan con la actividad de SOD, la primera enzima que actúa en el sistema antioxidante de protección a través de la dismutación del radical $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 (Sinha y Saxena, 2006). Este compuesto debe eliminarse en la secuencia de reacciones enzimáticas por CAT y APX. Por ende, como se notó en los contenidos de betacianina (Figura 1A) y peroxidación lipídica (Figura 1B), *A. philoxeroides* también presenta interacción significativa entre los tejidos y las concentraciones de sal que se analizaron para la actividad de SOD (Figura 2A). El nivel mayor de estrés (NaCl 400 mM) aumentó la actividad de esta enzima en hojas y raíces, en comparación con el control (89.41 a 18.31 %). Hubo una diferencia significativa entre tejidos, comparando el control y NaCl 200 mM con valores mayores en las raíces.

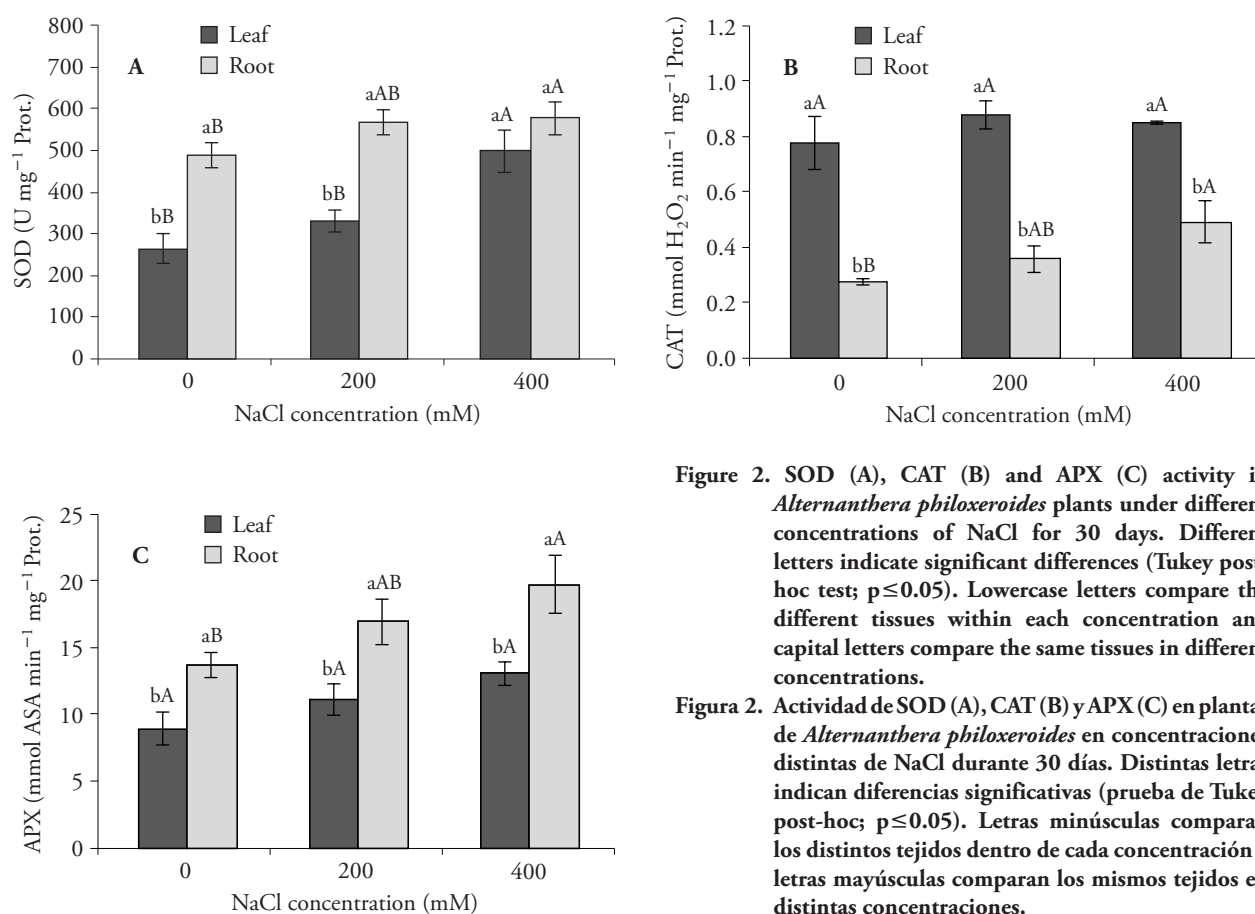


Figure 2. SOD (A), CAT (B) and APX (C) activity in *Alternanthera philoxeroides* plants under different concentrations of NaCl for 30 days. Different letters indicate significant differences (Tukey post-hoc test; $p \leq 0.05$). Lowercase letters compare the different tissues within each concentration and capital letters compare the same tissues in different concentrations.

Figura 2. Actividad de SOD (A), CAT (B) y APX (C) en plantas de *Alternanthera philoxeroides* en concentraciones distintas de NaCl durante 30 días. Distintas letras indican diferencias significativas (prueba de Tukey post-hoc; $p \leq 0.05$). Letras minúsculas comparan los distintos tejidos dentro de cada concentración y letras mayúsculas comparan los mismos tejidos en distintas concentraciones.

being significantly higher in the roots of plants in 400 mM NaCl (increase of 43.90 %) (Figure 2C). Regarding the differences between tissues (leaf and root), the highest activity was observed in roots in all treatments. Abiotic stresses, such as high salt concentrations, damage plant cells, directly or indirectly through the formation of ROS. To protect their membranes and organelles from the damaging effects of these radicals, plants must activate their antioxidant defense system. Besides, Wang *et al.* (2008b) described increases in the activity of antioxidant enzyme as a function of salt stress in *Iris lactea* Pall. var. *chinensis*, Dolatabadian *et al.* (2008) in canola plants, which were also reported by Azooz *et al.* (2009) in different maize cultivars, Carneiro *et al.* (2011) in sunflower seedlings and Deuner *et al.* (2011a) in *Vigna unguiculata* (L.) genotypes. A higher activity of SOD, CAT and APX was observed by Silva *et al.* (2011) in seeds and seedlings of two rice cultivars when irradiated with gamma rays and Co^{60} and Adamski *et al.* (2012) in plants of *Ipomoea batatas* (L.) subjected to high concentrations of iron in the culture medium.

Thus, joint analysis of the evaluated variables indicates that the reduction in levels of chlorophyll and carotenoids (Table 1) as a function of salinity stress, may have resulted in lower protection of the leaves, enhancing the formation of ROS, since plants ability to dissipate energy as heat or fluorescence may have been reduced. Moreover, electrons may have been incorporated into O_2 , leading to formation of the $\text{O}_2^{\bullet-}$ radical. Thus, the increase in SOD activity was faster in leaves (Figure 2A) for treatment with 400 mM NaCl, generating H_2O_2 , which is also a potentially damaging ROS. Its further removal was not evidenced by the activity of CAT (Figure 2B) and APX (Figure 2C). These enzymes belong to two different classes of detoxification enzymes due to their different affinities for the H_2O_2 (APX in the magnitude of μM and CAT in the magnitude of mM). Therefore, while APX would be responsible for the fine modulation of ROS signaling, the CAT would be responsible for removal of ROS excess generated during stress (Mittler, 2002). In the present study an increase in the activity of these enzymes in the leaves was not detected, which may justify the increased lipid peroxidation (Figure 1B) in plants subjected to 400 mM NaCl. Besides, in the roots, the increase in SOD activity as a function of salinity was

Esto puede justificar su incremento menor en comparación con las hojas, ya que con NaCl 400 mM no se detectaron diferencias entre los tejidos. Para CAT no hubo diferencias entre los tratamientos. Además, en raíces, el estrés salino indujo actividad mayor de esta enzima, con aumento significativo de 75 % para NaCl 400 mM en comparación con el control (Figura 2B).

La APX mostró un comportamiento similar considerando los tratamientos salinos, es decir, no difirió en las hojas y fue significativamente mayor en las raíces de plantas con NaCl 400 mM (aumento de 43.90 %) (Figura 2C). En términos de las diferencias entre tejidos (hoja y raíz), la actividad mayor se observó en las raíces en todos los tratamientos. El estrés abiótico, como las concentraciones altas de sal, daña las células vegetales directa o indirectamente a través de la formación de ROS. Para proteger sus membranas y organelos de los efectos dañinos de estos radicales, las plantas deben activar su sistema antioxidante de defensa. Además, Wang *et al.* (2008b) describieron incrementos en la actividad de enzimas antioxidantes como función del estrés salino en *Iris lactea* Pall. Var. *Chinensis*, Dolatabadian *et al.* (2008) en plantas de canola, que también lo reportaron Azooz *et al.* (2009) en distintas variedades de maíz, Carneiro *et al.* (2011) en plántulas de girasol y Deuner *et al.* (2011a) en genotipos de *Vigna unguiculata* (L.). Silva *et al.* (2011) observaron una mayor actividad de SOD, CAT y APX en semillas y plántulas de dos variedades de arroz cuando irradiadas con rayos gamma y Co^{60} , y Adamski *et al.* (2012) en plantas de *Ipomoea batatas* (L.) en concentraciones altas de hierro en el medio de cultivo.

Por lo tanto, el análisis conjunto de las variables evaluadas indica que la reducción en los niveles de clorofila y carotenoides (Cuadro 1), como función del estrés salino, puede haber producido protección menor de las hojas, acentuando la formación de ROS, ya que la habilidad de las plantas de disipar energía en forma de calor o fluorescencia puede haberse reducido. Además, es posible que se hayan incorporado electrones al O_2 , llevando a la formación del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Entonces, el incremento en actividad de SOD fue más rápido en las hojas (Figura 2A) para el tratamiento con NaCl 400 mM, generó H_2O_2 , que es también un ROS potencialmente dañino. Su eliminación posterior no se evidenció por la actividad de CAT (Figura 2B) y APX

accompanied by increases in CAT and APX activity, effectively eliminating the ROS and not leading to lipid peroxidation in this tissue.

CONCLUSIONS

Alternanthera philoxeroides (Mart.) Griseb. plants present reduction in levels of photosynthetic pigments when exposed to salt stress. However, the increased synthesis of betacyanins in the stem and increased activity of antioxidant enzymes in leaves and roots is thought to be the mechanism of tolerance that allows it to grow and develop in environments with high salt concentrations.

LITERATURE CITED

- Adamski, J. M., R. Danieloski, S. Deuner, E. J. B. Braga, L. S. de Castro, and J. A. Peters. 2012. Responses to excess iron in sweet potato: Impacts on growth, enzyme activities, mineral concentrations, and anatomy. *Acta Physiol. Plant.* 3: 1-7.
- Almeida, L. P. de, A. A. de Alvarenga, E. M. de Castro, S. M. Zanela, and C. V. Vieira. 2004. Early growth of plants of *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submitted to radiation solar levels. *Ciência Rural* 34: 83-88.
- Azeredo, H. M. C. 2009. Betalains: properties, sources, applications and stability – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44: 2365-2376.
- Azevedo, R. A., R. M. Alas, R. J. Smith, and P. J. Lea. 1998. 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. *Plant Physiol.* 104: 280-292.
- Azooz, M. M., A. M. Ismail, and M. F. Abou Elhamd. 2009. Growth, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities as a selection criterion for the salt tolerance of maize cultivars grown under salinity stress. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 21-26.
- Blum, C. T. 2008. Lista Preliminar de Espécies Vegetais da Formação Pioneira de Influência Marinha (Restinga) no Paraná - versão 2008: FLORAPARANÁ, Sociedade Chauá. www.chaua.org.br/restinga (Access: July 2010).
- Buckner, B., G. S. Johal, and D. Janick-Buckner. 2000. Cell death in maize. *Acta Physiol. Plant.* 108: 231-239.
- Buege, J. A., and S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
- Cai, Y., M. Sun, H. Wu, R. Huang, and H. Corke. 1998. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *J. Agr. Food Chem.* 46: 2063-2070.
- Carneiro, M. M. L. C., S. Deuner, P. V. de Oliveira, S. B. Teixeira, C. P. Sousa, M. A. Bacarin, and D. M. de Moraes. 2011. Antioxidant activity and the viability of sunflower seeds after saline and water stress. *Rev. Bras. Sementes* 33: 752-761.
- Deuner, C., M. de S. Maia, S. Deuner, A. da S. Almeida, and G. E. Meneghello. 2011a. Ability and antioxidant activity in seeds of cowpea genotypes submitted to salt stress. *Rev. Bras. Sementes* 33: 711-720.
- (Figura 2C). Estas enzimas pertenecen a dos clases diferentes de enzimas de desintoxicación debido a sus afinidades distintas por H₂O₂ (APX en magnitud de μ M y CAT en magnitud de mM). Por lo tanto, aunque APX sería responsable por la modulación fina del señalamiento ROS, CAT sería responsable por la eliminación de ROS excesivas generadas durante el estrés (Mittler, 2002). En este estudio no se detectó un aumento en la actividad de estas enzimas en las hojas, lo cual puede justificar el incremento de la peroxidación lipídica (Figura 1B) en plantas en NaCl 400 mM. Además, en las raíces, el aumento de la actividad SOD como una función de la salinidad estuvo acompañado de aumentos de la actividad de CAT y APX, eliminando efectivamente las ROS y evitando la peroxidación lipídica en este tejido.

CONCLUSIONES

Las plantas de *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. presentan reducción en los niveles de pigmentos fotosintéticos cuando se exponen a estrés salino. Sin embargo, se piensa que el aumento en la síntesis de betacianinas en el tallo y la mayor actividad de enzimas antioxidantes en hojas y raíces son el mecanismo de tolerancia que les permite crecer y desarrollarse en ambientes con concentraciones altas de sal.

—Fin de la versión en Español—



- Dolatabadian A., S. A. M. M. Sanavy, and N. A. Chashmi. 2008. The effects of foliar application of ascorbic acid (vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. *J. Agron. Crop Sci.* 194: 206-213.
- Fang, Z., J. Bouwkamp, and T. Solomos. 1998. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *Exp. Bot.* 49: 503-510.
- Flowers, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
- Giannopolitis, C. N., and S. K. Ries. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59: 309-314.
- Gao, J., X. Quang, L. Yin, and G. He. 2007. Isolation of cDNA clones for genes up-regulated in drought-treated *Alternanthera philoxeroides* root. *Mol. Biol. Rep.* 35: 485-488.
- García-Plazaola, J. I., and J. M. Becerril. 1999. A rapid HPLC method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem. Analysis* 10: 307-313.

- Hernández, J. A., J. Jiménez, P. Mullineaux, and F. Sevilla. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23: 853-862.
- Hoagland, D. R., and D. I. Arnon. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agr. Exp. Sta. Cir.* No. 347.
- Khan, M. H., and S. K. Panda. 2008. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol. Plant.* 30: 81-89.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *In: Packer, L., and R. Douce (eds). Method Enzimol.* 148: 350-381.
- Mandhania, S., S. Madan, and V. Sawhney. 2006. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Biol. Plantarum.* 227: 227-231.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 9: 405-410.
- Nakano, Y., and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Panda, S. K., and M. H. Khan. 2009. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. *J. Agron. Crop Sci.* 195: 442-454.
- Perotti, J. C., Rodrigues, I. C. S., Kleinowski, A. M., Ribeiro, M. V., Einhart, A. M., Peters, J. A., Bacarin, M. A. and Braga, E. J. B. 2010. Betacyanin production in alligator weed, grown *in vitro*, with different concentrations of copper sulfate. *Ciencia Rural* 40: 1874-1880.
- Pinheiro, H. A., J. V. Silva, L. Endres, V. M. Ferreira, C. A. Câmara, F. F. Cabral, J. F. Oliveira, L. W. T. Carvalho, F. K. P. Fonseca, and J. M. Santos. 2006. Alterações na fotossíntese e nos teores de pigmentos cloroplásticos em plântulas de mamona cultivadas sob condições de salinidade. <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/AlteracoesFotossintese.pdf> (Access: June 2010).
- Santos, C. V. 2004. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Sci. Hortic. -Amsterdam.* 103: 93-99.
- Savoure, A., D. Thorin, M. Davey, X. J. Hua, S. Mauro, M. Van Motagu, D. Inze and N. Verbruggen. 1999. NaCl and CuZnSO₄ treatments trigger distinct oxidative defense mechanism in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Cell Physiol.* 22: 387-396.
- Sepúlveda-Jiménez G., P. Rueda-Benítez, H. Porta and M. Rocha-Sosa. 2004. Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiol. Mol. Plant P.* 64: 125-133.
- Silva, A. S. da, R. Danielowski, E. J. B. Braga, S. Deuner, A. M. de Magalhães Junior, and J. Peters. 2011. Development of rice seedlings grown from pre-hydrated seeds and irradiated with gamma rays. *Cienc. Agrotec.* 35: 1093-1100.
- Sinha, S. and Saxena, R. 2006. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62: 1340-1350.
- Sumithra, K., P. P. Jutur, B. D. Carmel, and A. R. Reddy. 2006. Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism. *Plant Growth Regul.* 50: 11-22.
- Takamiya, K., I., T. Tsuchiya, and H. Ohta. 2000. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends Plant Sci.* 5: 426-431.
- Thompson, J. E., R. L. Ledge, and R. F. Barber. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* 105: 317-344.
- Vogt T., M. Ibdah, J. Schmidt, V. Wray, M. Nimtz, and D. Strak. 1999. Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochem.* 52: 583-592.
- Volp, A. C., I. R. T. Renhe, and P. C. Stringueta. 2009. Pigmentos naturais Bioativos. *Alimentos e Nutrição* 20: 157-166.
- Wang, C. Q., C. Xu, J. Wei, H. Wang, and S. Wang. 2008a. Enhanced tonoplast H⁺-ATPase activity and superoxide dismutase activity in the halophyte *Suaeda salsa* containing high level of betacyanin. *J. Plant Growth Regul.* 27: 58-67.
- Wang, Y., J. X. Guo, Q. L. Meng and X. Y. Cui. 2008b. Physiological responses of krishum (*Iris lactea* Pall. var. *chinensis* Koidz) to neutral and alkaline salts. *J. Agron. Crop Sci.* 194: 429-437.
- Zhang, S., J. Pan, T. Tu, S. Yao, and C. Xu. 2003. Study on the photogeneration of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosynth. Res.* 75: 41-48.