



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**ELTON CAMELO MARQUES**

**ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS DE MILHO À SALINIDADE MEDIADA PELO  
PRÉ-TRATAMENTO COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO**

**FORTALEZA**

**2013**

**ELTON CAMELO MARQUES**

**ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS DE MILHO À SALINIDADE MEDIADA PELO  
PRÉ-TRATAMENTO COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: *Prof. Dr. Enéas Gomes Filho*

Coorientador: *Prof. Dr. José Tarquinio Prisco*

**FORTALEZA**

**2013**

**ELTON CAMELO MARQUES**

**ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS DE MILHO À SALINIDADE MEDIADA PELO  
PRÉ-TRATAMENTO COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

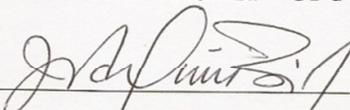
Aprovada em: 14/08/2013

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC



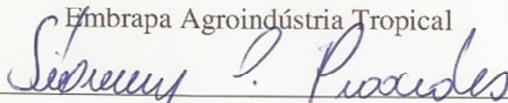
Prof. Dr. José Tarquinio Prisco (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC



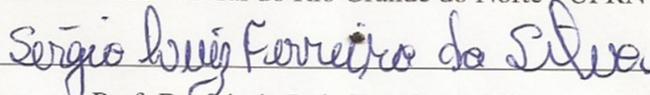
Dr. Marlos Alves Bezerra

Embrapa Agroindústria Tropical



Prof. Dr. Sidney Carlos Praxedes

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN



Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

**FORTALEZA**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

E316a Marques, Elton Camelo.  
Aclimação de plantas de milho à salinidade mediada pelo pré-tratamento com nitroprussiato de sódio / Elton Camelo Marques. – 2013.  
99 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.  
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.  
Coorientação: Prof. Dr. José Tarquinio Prisco.

1. Estresse oxidativo. 2. Estresse salino. 3. Nutrição mineral. 4. Óxido nítrico. 5. Milho. I. Título.

---

CDD 574.192

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, que durante toda a minha vida conduziu-me pelos caminhos por Ele traçados, fazendo-me chegar até aqui.

Aos meus pais *Antônio Castro Marques* e *Maria Camelo Marques*, a quem dedico este trabalho, um agradecimento especial pela abnegação, pelo apoio e pela compreensão despendidos durante toda a minha vida.

Aos meus demais familiares, que sempre torceram para que eu alcançasse meus objetivos.

À minha esposa e amiga *Alexcyane Rodrigues Feijão*, a quem dedico este trabalho, um agradecimento especial pelo apoio, carinho, compreensão e companheirismo dedicados a mim durante todos esses anos de convívio e que foram de extrema valia para a concretização desse trabalho.

Aos professores *Enéas Gomes Filho* e *José Tarquinio Prisco*, um agradecimento especial pela confiança depositada, orientação, apoio e incentivo durante esta etapa de minha formação acadêmica, sem, contudo, esquecer que foram os responsáveis pela minha iniciação científica.

Aos professores *Marlos Alves Bezerra*, *Sidney Carlos Praxedes* e *Sérgio Luiz Ferreira da Silva*, por aceitarem participar de minha banca examinadora, pela compreensão e pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Aos amigos *Rafael de Souza Miranda* e *Thiago Augusto Duarte de Menezes*, pelo companheirismo e pela ajuda em todas as etapas deste experimento.

À amiga *Rosilene Oliveira Mesquita*, pela inestimável ajuda durante as análises proteômicas.

Aos demais amigos e colegas que compõem ou compuseram o Laboratório de Fisiologia Vegetal, *Aiala Vieira Amorim*, *Alexandre Bosco de Oliveira*, *Carlos Eduardo Braga de Abreu*, *Cibelle Gomes Gadelha*, *Daniel Farias de Oliveira*, *Elaine Angelim Costa Cunha de Souza*, *Evaldo Heber Silva do Nascimento*, *Franklin Aragão Gondim*, *Gyedre dos Santos Araújo*, *Ian Nunes Valença*, *Irinaldo Lima do Nascimento*, *Prof. Joaquim Enéas Filho*, *Jones Batista Vidal*, *Juan Carlos Alvarez Pizarro*, *Lineker de Sousa Lopes*, *Luckas Huriel Duarte de Menezes*, *Michella de Albuquerque Lima Soares*, *Maria Lilian dos Santos Silva*, *Maria Liliane dos Santos Silva*, *Nara Lídia Mendes Alencar*, *Nathália Dias de Oliveira Amaral*, *Paulo André Ferreira de Freitas*, *Stelamaris de Oliveira Paula*, *Thalita Montoril Ferreira*, *Valdinéia Soares Freitas*, *Victor Freitas de Castro*, *Viviane Pinho de Oliveira* e

*Viviane Ruppenthal*, pela convivência e por me ajudaram direta ou indiretamente no decorrer deste trabalho.

À *Profa. Ana Cristina de Oliveira Monteiro*, da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), por disponibilizar o espaço e os recursos de seu laboratório, e ao *Dr. Frederico Bruno Mendes Batista Moreno*, pela ajuda durante as análises proteômicas.

Ao *Prof. Fernando Felipe Ferreyra Hernandez*, do Departamento de Ciências do Solo da UFC, por disponibilizar o espaço e os recursos de seu laboratório, e a *Sra. Fátima Rego da Silva*, pela ajuda durante as análises minerais.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, especialmente àqueles de quem tive a oportunidade de ser aluno, pelas experiências e pelos ensinamentos compartilhados comigo, bem como aos demais membros do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (estudantes e funcionários).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado durante os anos de 2009 a 2013.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal), que por meio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), concedeu auxílio financeiro para execução deste e de outros trabalhos do LABFIVE.

E por fim o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho e que não foram supracitadas.

## RESUMO

Neste estudo pretendeu-se avaliar a aclimação de plantas de milho (*Zea mays*) à salinidade, após serem pré-tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS, composto capaz de liberar óxido nítrico). A concentração de NPS utilizada foi definida em um primeiro experimento, no qual plantas de milho (variedade BR 5011) foram cultivadas por dois dias em solução nutritiva de Hoagland acrescida de NPS nas concentrações de 0 (plantas não pré-tratadas), 50, 75, 100 ou 200  $\mu\text{M}$ , e submetidas depois à salinidade (NaCl a 0 ou 80 mM). Decorridos sete dias, as plantas pré-tratadas com NPS a 75  $\mu\text{M}$  foram as que apresentaram melhor desempenho em condições salinas, tendo em vista que elas apresentaram um crescimento maior, uma menor peroxidação de lipídios nas folhas, um teor de  $\text{K}^+$  aumentado na planta e um menor teor de  $\text{Na}^+$  na parte aérea, em comparação às demais plantas nas condições salinas. Com base nisso, foi realizado um segundo experimento, no qual a aclimação de plantas de milho, mediada pelo pré-tratamento com NPS a 75  $\mu\text{M}$ , foi avaliada após 7 e 14 dias de estresse (NaCl a 80 mM). O pré-tratamento das plantas com NPS resultou em uma área foliar aumentada e em maior crescimento em condições salinas, em comparação às plantas não pré-tratadas, mas isso foi observado apenas aos 7 dias de estresse. Apesar de o estresse salino ter reduzido a condutância estomática das plantas nos dois tempos avaliados, houve aumento da fotossíntese líquida e da transpiração quando se pré-tratou as plantas com NPS. De modo geral, o estresse salino reduziu os teores de macronutrientes nas plantas de milho, em ambos os tempos de estresse, mas isso foi menos evidente naquelas que haviam sido pré-tratadas com NPS, especialmente aos 7 dias de estresse. Os danos oxidativos nas folhas e nas raízes das plantas de milho foram parcialmente atenuados pelo pré-tratamento com NPS. Nas condições salinas, os teores de ascorbato e glutatona foram geralmente maiores nas plantas pré-tratadas com NPS do que nas não pré-tratadas. De modo geral, a atividade das enzimas dismutase do superóxido, catalase e peroxidase do ascorbato nas folhas e nas raízes de milho foi reduzida pelo pré-tratamento com NPS, e isso também dependeu do tempo de estresse a que as plantas foram submetidas. No entanto, houve pouca correlação entre o pré-tratamento com NPS e a indução do sistema antioxidativo. A espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida permitiu a identificação de diversas proteínas nos tecidos foliares e radiculares, entre as quais, proteínas envolvidas com a fotossíntese e com o metabolismo oxidativo, e, de maneira geral, a expressão delas foi influenciada pelas condições a que as plantas estiveram sujeitas. O pré-tratamento com NPS induz alterações

importantes nas plantas de milho, mais relacionadas à homeostase iônica que à defesa oxidativa, que não perduram ao longo do desenvolvimento da planta.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, estresse salino, expressão proteica, nutrição mineral, óxido nítrico, *Zea mays*.

## ABSTRACT

This study was intended to evaluate the acclimation of maize (*Zea mays*) plants to salt stress, after pretreatment with sodium nitroprusside (SNP, a NO donor compound). The SNP concentration used was defined in an initial experiment, in which maize plants (variety BR 5011) were cultivated for two days in Hoagland solution plus NPS at 0 (not pretreated plants), 50, 75, 100 or 200 mM and then subjected to salt stress (NaCl at 0 or 80 mM). After seven days, the plants pretreated with NPS at 75  $\mu$ M showed the best performance in saline conditions, considering that they had a higher growth, a lower lipid peroxidation in leaves, an increased  $K^+$  content and a lower  $Na^+$  content in shoots compared to other plants in saline conditions. Based on this, it was performed a second experiment, in which the maize acclimation mediated by the pretreatment with 75  $\mu$ M SNP was evaluated after 7 and 14 days of stress salt (80 mM NaCl). The SNP-pretreatment resulted in an increased leaf area and a fastest growing in saline conditions as compared to non-pretreated plants, but this difference was observed only after 7 days of stress. Although salt stress have reduced stomatal conductance in both time periods, there was an increase in the net photosynthesis and transpiration when plants were pretreated with NPS. In general, the salt stress reduced the macronutrient content in plants, in both times of stress, but this was less evident in those who had been pretreated with NPS, especially after 7 days of stress. Oxidative damages in leaves and roots of maize plants have been partially mitigated by pretreatment with SNP. In saline conditions, the contents of ascorbate and glutathione were generally highest in plants pretreated with NPS than in non-pretreated. In general, the activity of superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase in leaves and roots of maize was reduced by pretreatment with SNP, and it also depended on the time of stress to which the plants were subjected. However, there was little correlation between pretreatment with SNP and induction of antioxidant system. The mass spectrometry-coupled liquid chromatography allowed the identification of several proteins in leaf and root tissues, including proteins involved in photosynthesis and oxidative metabolism and, in general, their expression was influenced by the conditions that plants were subjected. The pretreatment with SNP induced important changes in corn plants more closely related to the oxidative homeostasis that protection, which does not persist throughout plant development.

**Keywords:** Oxidative stress, salt stress, protein expression, mineral nutrition, nitric oxide, *Zea mays*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Área foliar e massa seca da parte aérea, das raízes e total de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) e cultivadas na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 43
- Figura 2.** Vazamento de eletrólitos e teores de TBARS de folhas e raiz de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS e cultivadas na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 45
- Figura 3.** Teores de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> na parte aérea e na raiz de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS e cultivadas na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 47
- Figura 4.** Análise conjunta das alterações induzidas pelo pré-tratamento com NPS em plantas de milho (*Zea mays*) cultivadas na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 48
- Figura 5.** Área foliar e massa seca da parte aérea, da raiz e total de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 µM e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 49
- Figura 6.** Condutância estomática, fotossíntese líquida, transpiração, relação entre as concentrações interna e externa de CO<sub>2</sub>, déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar adjacente e eficiência de carboxilação de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 µM e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 51
- Figura 7.** Teores de K e Na na parte aérea e na raiz de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 µM e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 54
- Figura 8.** Teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e Cl<sup>-</sup> na parte aérea e na raiz de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 µM e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 56
- Figura 8.** Teores de Ca e Mg na parte aérea e na raiz de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 µM e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 59
- Figura 10.** Teores de S e P na parte aérea e na raiz de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 µM e cultivadas durante 7 ou 14 dias na

ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.....	62
<b>Figura 11.</b> Teores de N na parte aérea e na raiz de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> ) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 $\mu$ M e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.....	64
<b>Figura 12.</b> Vazamento de eletrólitos, teores de TBARS e teores de grupos carbonila nas folhas e na raiz de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> ) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 $\mu$ M e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.....	66
<b>Figura 13.</b> Teores de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) nas folhas e na raiz de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> ) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 $\mu$ M e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.....	68
<b>Figura 14.</b> Teores de ascorbato reduzido e oxidado e status redox do ascorbato nas folhas e na raiz de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> ) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 $\mu$ M e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.....	70
<b>Figura 15.</b> Teores de glutathiona reduzida e oxidada e status redox da glutathiona nas folhas e na raiz de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> ) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 $\mu$ M e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.....	72
<b>Figura 16.</b> Atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) nas folhas e na raiz de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> ) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 $\mu$ M e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.....	74
<b>Figura 17.</b> Atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) nas folhas e na raiz de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> ) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 $\mu$ M e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.....	75

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Eficiências de absorção e de transporte de K e Na em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 55
- Tabela 2.** Eficiências de absorção e de transporte de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{Cl}^-$  em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 57
- Tabela 3.** Eficiências de absorção e de transporte de Ca e Mg em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 60
- Tabela 4.** Eficiências de absorção e de transporte de S e P em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 63
- Tabela 5.** Eficiências de absorção e de transporte de N em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 65
- Tabela 6.** Proteínas diferencialmente expressas em folhas de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 77
- Tabela 7.** Proteínas diferencialmente expressas em folhas de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 78
- Tabela 8.** Proteínas diferencialmente expressas em raízes de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 81
- Tabela 9.** Proteínas diferencialmente expressas em raízes de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM..... 82

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A* – Taxa de fotossíntese líquida
- APX** – Peroxidase do ascorbato
- ASC** – Ascorbato (reduzido)
- ASC/(ASC + DHA)** – *Status* redox do ascorbato
- ASC-GSH** – Ciclo ascorbato-glutationa
- CAT** – Catalase
- $C_i/C_a$  – Relação entre as concentrações interna e externa de CO<sub>2</sub>
- DHA** – Desidroascorbato
- DHAR** – Redutase do desidroascorbato
- E* – Transpiração
- EA** – Eficiência de absorção
- ET** – Eficiência de transporte
- G-POD** – Peroxidase do guaiacol
- GPX** – Peroxidase da glutaciona
- GR** – Redutase da glutaciona
- $g_s$  – Condutância estomática
- GSH** – Glutaciona (reduzida)
- GSSG** – Glutaciona oxidada
- GSH/(GSH + GSSG)** – *Status* redox da glutaciona
- MDHA** – Monodesidroascorbato
- MDHAR** – Redutase do monodesidroascorbato
- NO** – Óxido nítrico
- NPS** – Nitroprussiato de sódio
- ROS** – Espécies reativas de oxigênio
- SOD** – Dismutase do superóxido
- TBARS** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- VE** – Vazamento de eletrólitos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Justificativa</b> .....	14
<b>1.2 Objetivos</b> .....	16
1.2.1 <i>Objetivo geral</i> .....	16
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	16
<b>1.3 Revisão de literatura</b> .....	17
1.3.1 <i>Estresse salino</i> .....	17
1.3.2 <i>Estresse salino e as plantas</i> .....	18
1.3.3 <i>Estresse oxidativo e as plantas</i> .....	20
1.3.3.1 <i>Espécies reativas de oxigênio</i> .....	20
1.3.3.2 <i>Mecanismos enzimáticos de eliminação de ROS</i> .....	23
1.3.3.3 <i>Mecanismos não enzimáticos de eliminação de ROS</i> .....	26
1.3.4 <i>Aclimação ao estresse salino</i> .....	28
1.3.5 <i>Óxido nítrico</i> .....	30
1.3.5.1 <i>Aclimação a estresses mediada pelo óxido nítrico</i> .....	32
1.3.6 <i>O milho</i> .....	32
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
<b>2.1 Experimento I – Escolha da concentração de NPS adequada para o pré-tratamento das plantas de milho</b> .....	33
2.1.1 <i>Semeadura, condições de cultivo e tratamentos</i> .....	33
2.1.2 <i>Coleta das plantas e análise do crescimento</i> .....	33
2.1.3 <i>Teores de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup></i> .....	34
2.1.4 <i>Vazamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios</i> .....	34
2.1.5 <i>Análise estatística</i> .....	35
<b>2.2 Experimento II – Aclimação à salinidade mediada pelo pré-tratamento com NPS a 75 µM</b> .....	35

2.2.1 Semeadura, condições de cultivo e tratamentos.....	35
2.2.2 Trocas gasosas, coleta das plantas e análise do crescimento.....	36
2.2.3 Análises minerais.....	36
2.2.4 Vazamento de eletrólitos, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas.....	38
2.2.5 Teores de $H_2O_2$ e $O_2^{\bullet-}$ .....	38
2.2.6 Teores de ascorbato e glutatona.....	39
2.2.7 Enzimas antioxidantes.....	39
2.2.8 Análises proteômicas.....	40
2.2.8.1 Extração das proteínas.....	40
2.2.8.2 Preparação das amostras e digestão triptica.....	41
2.2.8.3 Espectrometria de massa e identificação das proteínas.....	42
2.2.9 Análise estatística.....	42
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Experimento I – Escolha da concentração de NPS adequada para o pré-tratamento das plantas de milho.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Experimento II – Aclimação à salinidade mediada pelo pré-tratamento com NPS a 75 <math>\mu</math>M.....</b>	<b>53</b>
3.2.1 Análise do crescimento e trocas gasosas.....	53
3.2.2 Análises minerais.....	56
3.2.3 Vazamento de eletrólitos, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas e teores de $H_2O_2$ e $O_2^{\bullet-}$ .....	65
3.2.4 Ascorbato e glutatona.....	69
3.2.5 Enzimas antioxidantes.....	73
3.2.6 Análises proteômicas nas folhas.....	76
3.2.7 Análises proteômicas nas raízes.....	79
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Justificativa

A salinidade é um dos estresses abióticos que mais limitam a produtividade agrícola (MUNNS, 2002; FLOWERS, 2004), em razão de seus efeitos no crescimento e no desenvolvimento vegetal, os quais podem ser de natureza iônica ou osmótica (GREENWAY; MUNNS, 1980; HASEGAWA *et al.*, 2000). Em 2000, estimava-se que 19,5% das áreas irrigadas em todo o mundo — correspondente a 45 milhões de hectares — enfrentavam problemas de salinidade, e no Brasil este percentual encontrava-se entre 20 e 25%, concentrado principalmente na região Nordeste (FAO, 2000).

O grau com que a salinidade afeta as plantas depende de fatores intrínsecos a elas (espécie, cultivar e estágio de desenvolvimento), fatores relacionados ao estresse (tipo de sal, concentração salina, duração e modo da exposição aos sais) e fatores ambientais (luz, temperatura e umidade relativa do ar, composição iônica e granulometria do solo), bem como da interação entre eles (GREENWAY; MUNNS, 1980; MUNNS; TERMAAT, 1986; SHANNON; GRIEVE, 1999; BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000). Enquanto algumas espécies apresentam elevada tolerância à salinidade (halófitas), outras são altamente susceptíveis (glicófitas), e convém salientar que a maioria das espécies cultivadas tem seu crescimento inibido ou retardado pela salinidade, mesmo em baixas concentrações de sais (GREENWAY; MUNNS, 1980; CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005).

Um dos eventos bioquímicos que ocorrem nas plantas e em outros seres aeróbicos é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são geradas durante o metabolismo celular normal, principalmente em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, a partir da redução monovalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ). As ROS mais comumente encontradas são o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais superóxido ( $\cdot O_2^-$ ) e hidroxil ( $HO\cdot$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; APEL; HIRT, 2004; AZEVEDO-NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008).

As ROS são empregadas como moléculas sinalizadoras em diferentes processos celulares, com efeitos no crescimento e no desenvolvimento, no ciclo celular, na apoptose, na senescência e nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (FINKEL, 2003). Em condições adversas, porém, a produção de ROS pode ser aumentada, podendo acarretar prejuízos ao metabolismo, em decorrência de danos oxidativos a proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membrana (MITTOVA *et al.*, 2002; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007).

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de remoção (de natureza enzimática e não enzimática) de ROS, sobrepujando, assim, seus efeitos tóxicos (MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008). Dentre o sistema enzimático, destaca-se uma grande variedade de enzimas, tais como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX). Por outro lado, o sistema não enzimático é formado por antioxidantes de baixo peso molecular, tais como ascorbato, tocoferol e glutathione reduzida (ASADA 1999; FOYER; NOCTOR, 2005). Dessa forma, é de fundamental importância entender a regulação desses sistemas de remoção de ROS na mediação da tolerância de plantas aos estresses ambientais (SHI *et al.*, 2007).

A sobrevivência de uma planta sob estresse depende da sua capacidade de se aclimatar a esse estresse, que envolve mudanças fisiológicas, bioquímicas e morfológicas que não são transmitidas para as gerações futuras (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010). Quando a aclimação a um determinado estresse é intensificada pela exposição a um estresse anterior (de mesmo tipo ou diferente), tem-se a tolerância cruzada. Entre os exemplos de estudos sobre a aclimação ao estresse salino mediada por tolerância cruzada, podem-se citar o pré-tratamento de plantas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (UCHIDA *et al.*, 2002; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005; WAHID *et al.*, 2007; GONDIM *et al.*, 2010), ácido salicílico (GUNES *et al.*, 2007) e compostos que liberam óxido nítrico (HU *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; SUNG; HONG, 2010).

O óxido nítrico (NO) é um composto gasoso e altamente reativo (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007). Nos últimos anos, têm-se demonstrado o envolvimento do NO em diversos processos fisiológicos das plantas, tais como a regulação da germinação e da dormência de sementes, da maturação, da senescência e da floração, a mediação da abertura estomática (juntamente ao ácido abscísico), o gravitropismo e as respostas aos estresses bióticos e abióticos (BESSON-BARD; PUGIN; WENDEHENNE, 2008; QIAO; FAN, 2008; SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011). O NO está diretamente relacionado ao metabolismo oxidativo em plantas (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007), pois contribui para a manutenção de níveis baixos de ROS e aumenta a atividade das enzimas do sistema antioxidativo, através de mudanças na transcrição dos genes relacionados a elas (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011).

A aplicação exógena de NO (ou de compostos que liberam NO) pode conferir às plantas tolerância aos estresses salino (UCHIDA *et al.*, 2002), hídrico (GARCÍA-MATA; LAMATTINA, 2001) e ao causado por metais pesados (KOPYRA; GWÓZDŹ, 2003; HU *et al.*, 2007). Nessas abordagens, o NO funciona tanto como uma molécula sinalizadora, quanto como um agente indutor de tolerância cruzada.

O milho, espécie cultivada em todo o Brasil, servindo tanto para a alimentação humana como animal, é considerado moderadamente sensível à salinidade; seu crescimento é afetado a partir de  $1,6 \text{ dS m}^{-1}$ , embora esse efeito varie entre os diferentes cultivares existentes (MASS; HOFFMAN, 1977). Portanto, dada a importância econômica do milho e sua relativa sensibilidade aos sais, o estudo dos efeitos do NO na indução de aclimatação à salinidade em plantas de milho torna-se relevante.

## **1.2 Objetivos**

### ***1.2.1 Objetivo geral***

Pretendeu-se avaliar aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na aclimatação de plantas de milho à salinidade após pré-tratamento com nitroprussiato de sódio (NPS), um composto capaz de liberar NO em solução.

### ***1.2.2 Objetivos específicos***

Utilizando-se como material vegetal a variedade de milho BR 5011, foram avaliados os efeitos do pré-tratamento com NPS:

- na área foliar e no acúmulo de massa seca das plantas, em condições controle e de estresse salino;
- nas trocas gasosas (condutância estomática, fotossíntese líquida, transpiração e concentração interna de  $\text{CO}_2$ ) das plantas, em condições controle e de estresse salino;
- nos teores dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea e nas raízes das plantas, em condições controle e de estresse salino;
- nos teores de macronutrientes (K, Ca, Mg, N, S e P) na parte aérea e nas raízes das plantas, em condições controle e de estresse salino;
- nos teores de peróxido de hidrogênio e superóxido nas folhas e nas raízes das plantas, em condições controle e de estresse salino;
- no vazamento de eletrólitos, na peroxidação de lipídios e na oxidação de proteínas de folhas e raízes das plantas, em condições controle e de estresse salino;

- nos teores de ascorbato e glutatona de folhas e raízes, bem como nos seus respectivos *status* redox, em condições controle e de estresse salino;
- na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX de folhas e raízes, em condições controle e de estresse salino;
- na expressão proteica diferencial de folhas e raízes das plantas, em condições controle e de estresse salino.

### 1.3 Revisão de literatura

#### 1.3.1 Estresse salino

No contexto biológico, define-se o termo estresse como sendo qualquer alteração nas condições ótimas de um ser vivo, a qual modifica todos os seus níveis funcionais, limita o seu desenvolvimento e reduz as suas possibilidades de sobrevivência (LARCHER, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009). As plantas estão sempre sujeitas a condições de estresses múltiplos, os quais podem ter origem biótica ou abiótica (LARCHER, 2000). Entre os inúmeros estresses abióticos aos quais as plantas estão constantemente expostas, destaca-se o estresse salino, um dos que mais comprometem a produtividade agrícola mundial (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003; FLOWERS, 2004; MAHAJAN; TUTEJA, 2005; CONDE; CHAVES; GERÓS, 2011), chegando a afetar mais de 800 milhões de hectares no mundo (MUNNS; TESTER, 2008; TÜRKAN; DEMIRAL, 2009; HASEGAWA, 2013).

Um solo é considerado salino quando a condutividade elétrica de seu extrato de saturação é maior que  $4,0 \text{ dS m}^{-1}$  (RICHARDS, 1954). Os principais íons encontrados nos solos salinos são os cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e os ânions  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ ; em menor quantidade, encontram-se os íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{NO}_3^-$  (DAKER, 1988; CORDEIRO, 2001; YADAV *et al.* 2011; BUI, 2013). Todos os solos contêm sais, porém isso se torna preocupante quando determinadas condições favorecem o acúmulo deles nas suas camadas mais superficiais, impactando negativamente a produção agrícola, o meio ambiente e a economia (RENGASAMY, 2006).

A origem natural dos sais no solo decorre: a) do intemperismo de rochas e minerais da crosta terrestre, os quais têm seus constituintes gradualmente liberados, tornando-se solúveis; b) do avanço da água do mar, que além de contribuir para a salinização em áreas costeiras, também pode afetar rios e aquíferos; e c) da deposição de materiais oceânicos

trazidos pelo vento ou dissolvidos na água da chuva (DAKER, 1988; RENGASAMY, 2006; YADAV *et al.* 2011; PLAUT; EDELSTEIN; BEN-HUR, 2013).

A salinização dos solos também resulta da ação antrópica, a qual está relacionada fortemente a certas práticas agrícolas, tais como o uso de água de irrigação de baixa qualidade, associado a uma drenagem e a um manejo do solo inadequados (CORDEIRO, 2001; RENGASAMY, 2006; YADAV *et al.* 2011; PLAUT; EDELSTEIN; BEN-HUR, 2013). Esses problemas na agricultura, oriundos da salinidade, existem há bastante tempo e foram relatados já na antiga civilização suméria, que povoou a região sudeste da Mesopotâmia durante os anos 4.100 a.C. a 2.000 a.C., cuja produção agrícola dependia da água dos rios Eufrates e Tigre (JACBOSEN; ADAMS, 1958; RENGASAMY, 2006; PLAUT; EDELSTEIN; BEN-HUR, 2013).

Os solos salinos podem ser encontrados em todos os continentes (exceto a Antártida) e em qualquer zona climática, mas se concentram em regiões de clima árido e semiárido, onde a evaporação intensa e a lixiviação incompleta concorrem para a concentração dos sais no solo e nas águas superficiais (DAKER, 1988; RENGASAMY, 2006, 2010; BUI, 2013). Nessas regiões, a salinização do solo é praticamente irreversível, pois a lixiviação dos sais acumulados é limitada, em razão da escassez de água doce, seja pluvial, seja subterrânea (ROZEMA; FLOWERS, 2008).

### ***1.3.2 Estresse salino e as plantas***

As consequências da salinidade às plantas devem-se principalmente aos efeitos desse estresse no crescimento e no desenvolvimento vegetal, os quais podem ser de natureza iônica, osmótica ou de ambas (GREENWAY; MUNNS, 1980; HASEGAWA *et al.*, 2000; MUNNS; TESTER, 2008; HASEGAWA, 2013). Os efeitos iônicos resultam da elevada absorção de íons, especialmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , que alteram a homeostase iônica da célula quando em altas concentrações, a qual é de importância fundamental para a atividade de muitas enzimas citosólicas e para a manutenção do potencial de membrana celular (NIU *et al.*, 1995; HASEGAWA *et al.*, 2000; ZHU, 2003; YU; WANG; WANG, 2012). Os efeitos osmóticos, por sua vez, são decorrentes da redução do potencial hídrico do ambiente radicular, que acarreta a diminuição da disponibilidade de água para a planta (GREENWAY; MUNNS, 1980; MUNNS, 2002; MUNNS; TESTER, 2008). Secundariamente, a salinidade também induz o estresse oxidativo, ao provocar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), que são prejudiciais à célula quando em altas concentrações,

causando danos oxidativos às biomoléculas (MITTLER, 2002; AZEVEDO NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008). Durante o estresse salino, todos os principais processos da planta, tais como a fotossíntese, a respiração, a síntese proteica, as relações hídricas e as reações enzimáticas, são afetados (MUNNS, 2002; PARIDA; DAS, 2005); os sais em excesso, portanto, podem conduzir a planta à morte (MANSOUR; SALAMA, 2004).

O grau com que a salinidade afeta as plantas dependerá de fatores intrínsecos ao indivíduo (espécie, cultivar e estágio de desenvolvimento), fatores relacionados ao estresse (tipo de sal, concentração salina, tempo de exposição aos sais e seu modo de aplicação) e fatores ambientais (luz, temperatura e umidade relativa do ar, composição iônica e granulometria do solo), bem como da interação entre eles (GREENWAY; MUNNS, 1980; MUNNS; TERMAAT, 1986; SHANNON; GRIEVE, 1999; BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000). Enquanto algumas espécies apresentam elevada tolerância à salinidade (halófitas), requerendo inclusive um ambiente salino para que seu ciclo de vida seja completado, outras são altamente susceptíveis aos sais (glicófitas). A maioria das culturas é afetada quando a condutividade elétrica do extrato de saturação do solo é superior a  $3,0 \text{ dS m}^{-1}$  (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005). Convém salientar que a maioria das espécies cultivadas tem seu crescimento inibido ou retardado pelos sais, mesmo em baixas concentrações (GREENWAY; MUNNS, 1980).

As plantas respondem primariamente ao estresse salino através da ativação de um ou mais mecanismos de sobrevivência, adquiridos durante o seu processo evolutivo. Entre eles, podem-se citar: a) o controle da absorção de íons pela raiz e do seu transporte para as folhas; b) a compartimentação de íons, no nível celular ou na planta inteira; c) o acúmulo de solutos orgânicos compatíveis no citoplasma; d) as alterações na estrutura da membrana plasmática; e) a indução da expressão e da atividade de enzimas antioxidantes; e f) a alteração no balanço hormonal. Isoladamente ou em conjunto, esses mecanismos têm por finalidade minimizar os danos causados pelo estresse salino às plantas, culminando no restabelecimento da homeostase celular e, finalmente, na retomada do crescimento vegetal, mesmo que a uma velocidade reduzida (GREENWAY; MUNNS, 1980; HASEGAWA *et al.*, 2000; ZHU, 2001; MANSOUR; SALAMA, 2004; BOTELLA *et al.*, 2005; PARIDA; DAS, 2005; MUNNS; TESTER, 2008). Espécies incapazes de restaurarem sua homeostase e de crescerem nessas condições estressantes, devido à ausência ou à ineficiência dos mecanismos citados, sofrerão invariavelmente mais danos.

### 1.3.3 Estresse oxidativo e as plantas

#### 1.3.3.1 Espécies reativas de oxigênio

Um dos eventos bioquímicos que ocorrem nas plantas e em outros seres aeróbicos é a produção de ROS, que são subprodutos inevitáveis do metabolismo celular aeróbico e dos processos fotooxidativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; NOCTOR; FOYER, 1998). Sob condições ótimas, a produção de ROS nas plantas é mantida em níveis compatíveis com o metabolismo normal, entretanto, em condições adversas, ela pode ser drasticamente aumentada, gerando um estresse secundário, o estresse oxidativo (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003), o qual é definido pelo desequilíbrio na relação entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros (GILL; TUTEJA, 2010). Nessa condição, as ROS podem causar danos aos diversos componentes da célula, como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (MITTOVA *et al.*, 2002; APEL; HIRT, 2004; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007).

O O<sub>2</sub> é uma molécula relativamente estável, que não causa danos diretos aos constituintes celulares, entretanto, quando ele absorve energia radiante ou é reduzido por meio da acepção de elétrons, há a formação de ROS; o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e os radicais superóxido (<sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e hidroxil (HO<sup>•</sup>) são as ROS mais comumente encontradas (APEL; HIRT, 2004; AZEVEDO-NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008; ABOGADALLAH, 2010).

No seu estado fundamental, o O<sub>2</sub> possui dois elétrons desemparelhados, situados em orbitais diferentes e com *spins* paralelos, mas essa configuração é alterada quando a energia de uma molécula excitada próxima é captada. Nesse caso, um dos seus elétrons desemparelhados sofre reversão do *spin*, tornando-se antiparalelo, o que aumenta drasticamente a capacidade reativa da molécula resultante (KRIEGER-LISZKAY, 2005). Essa é a origem do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, que é produzido principalmente no fotossistema II e no complexo antena adjacente, a partir da energia de excitação de suas clorofilas constituintes (ABOGADALLAH, 2010; GILL; TUTEJA, 2010). Embora o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> possua meia-vida curta (1 μs), ele é capaz de se difundir a distâncias consideráveis no interior da célula (centenas de nanômetros), podendo causar danos oxidativos extensos ao aparato fotossintético, especialmente à proteína D1 do centro de reação do fotossistema II e aos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas dos tilacoides (KRIEGER-LISZKAY, 2005; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007).

Nos organismos que realizam fotossíntese oxigênica e respiração aeróbica, há a transferência de quatro elétrons durante a reação redox em que o par  $O_2/H_2O$  está envolvido, não havendo, contudo, liberação de intermediários reativos parcialmente reduzidos durante essa reação. Entretanto, a redução monovalente do  $O_2$  também pode ocorrer em alguns compartimentos celulares, levando à produção sequencial de  $\bullet O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $HO\bullet$ , à medida que o  $O_2$  aceita um, dois ou três elétrons, respectivamente (FOYER; NOCTOR, 2003; HALLIWELL, 2006).

A produção de  $\bullet O_2^-$  pode ocorrer em qualquer sítio celular que possua uma cadeia transportadora de elétrons (CTE), como cloroplastos e mitocôndrias, e em outros locais que possuem atividade metabólica altamente oxidante (MITTLER *et al.* 2004; FOYER; NOCTOR, 2005). Nos cloroplastos, o  $\bullet O_2^-$  é formado no fotossistema I por meio da reação de Mehler, na qual os elétrons são transferidos da ferredoxina diretamente para moléculas de  $O_2$ , em detrimento da redução do  $NADP^+$ ; nas mitocôndrias, os complexos I e III são os principais sítios responsáveis pela produção dessa ROS (GILL; TUTEJA, 2010). Em ambas as organelas, a produção de  $\bullet O_2^-$  é favorecida quando a CTE está super-reduzida (fluxo em excesso de elétrons e baixa concentração de aceptores finais). Outros locais onde pode haver formação de  $\bullet O_2^-$  são o peroxissomo (a cargo da enzima oxidase da xantina e de proteínas de membrana dependentes de  $NAD(P)H$ ), o retículo endoplasmático (em reações de desintoxicação em que a enzima citocromo  $P_{450}$  está envolvida) e a membrana plasmática (sob ação da enzima oxidase do  $NADPH$ ) (del RÍO *et al.*, 2006; GILL; TUTEJA, 2010). A reatividade do  $\bullet O_2^-$  com proteínas é elevada, especialmente com as possuidoras de centro Fe-S, mas é baixa ou nula com lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). A forma protonada desse radical ( $HO_2\bullet$ ; radical peridroxil), porém, pode ocasionar a peroxidação de lipídios e a inibição de diversas enzimas (JALLEL *et al.*, 2009; GILL; TUTEJA, 2010).

O  $H_2O_2$  possui meia-vida longa (1 ms) e percorre distâncias de até 1  $\mu m$ ; é moderadamente reativo, tendo afinidade principalmente a grupos sulfidril de proteínas (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Ele é continuamente formado nos mesmos sítios em que o  $\bullet O_2^-$  é produzido, após a dismutação desse radical, seja espontaneamente, seja mediada pela enzima dismutase do superóxido (SOD), a qual aumenta a velocidade dessa reação em 10.000 vezes (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; PERL-TREVES; PERL, 2002; QUAN *et al.*, 2008; GILL; TUTEJA, 2010). Adicionalmente, a formação do  $H_2O_2$  nos peroxissomos dá-se pela atividade das enzimas oxidase do glicolato (envolvida na

fotorrespiração) e oxidase dependente de flavina, ou como subproduto da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (GILL; TUTEJA, 2010).

O radical  $\text{HO}^\bullet$  destaca-se como o mais reativo entre as ROS conhecidas, podendo ocasionar danos a todos os tipos de componentes celulares (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Ele é formado através de uma reação catalisada por metais de transição, especialmente ferro (Fe) e cobre (Cu), na qual  $^\bullet\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  encontram-se envolvidos. No primeiro passo, conhecido como reação de Fenton, o íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) é oxidado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  a íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), produzindo o radical  $\text{HO}^\bullet$  e o ânion hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). Em seguida, há a regeneração do  $\text{Fe}^{2+}$ , tendo o  $^\bullet\text{O}_2^-$  como agente redutor, produzindo  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{O}_2$ , garantindo-se assim a continuidade do primeiro passo da reação (PERL-TREVES; PERL, 2002; GILL; TUTEJA, 2010). Uma importante estratégia para evitar a formação inadvertida de  $\text{HO}^\bullet$  na célula é a manutenção da concentração de íons metálicos de transição em níveis extremamente baixos, limitando assim a reação de Fenton (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007).

Embora sejam consideradas subprodutos do metabolismo celular, ao longo da evolução, as ROS passaram a ser empregadas pelas plantas como moléculas sinalizadoras em diferentes processos celulares, tais como no crescimento e desenvolvimento, no ciclo celular, na apoptose, na senescência e nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (FINKEL, 2003; MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008). Uma vez que as ROS possuem esse duplo papel, é necessário que as células possuam pelo menos dois processos de regulação das concentrações dessas espécies: um que as tornem capazes de modular as ROS em níveis baixos, para propósitos de sinalização, e outro que permita a eliminação de ROS em excesso, especialmente em condições de estresse (MITTLER, 2002). Em função disso, as plantas desenvolveram mecanismos para manter a relação produção/eliminação de ROS constante no interior das células (APEL; HIRT, 2004), utilizando, para esse fim, os sistemas de defesa enzimático e não enzimático (ASADA, 1999). A importância da coordenação entre esses dois sistemas no processo de remoção de ROS está cada vez mais evidente e isso está relacionado com a tolerância das plantas à salinidade (MITTOVA *et al.*, 2002; MELONI *et al.*, 2003; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005).

### ***1.3.3.2 Mecanismos enzimáticos de eliminação de ROS***

As principais enzimas do sistema antioxidativo são a SOD (E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6), a peroxidase do ascorbato (APX; E.C. 1.11.1.11), a peroxidase

da glutathiona (GPX; E.C. 1.11.1.9) e a peroxirredoxina (PrxR; E.C. 1.11.1.15) (MITTLER *et al.*, 2004), mas outras enzimas, tal como a peroxidase do guaiacol (G-POD; E.C. 1.11.1.7), também podem contribuir para a eliminação de ROS. Embora não sejam responsáveis pela eliminação direta de ROS, certas enzimas são extremamente necessárias para o bom funcionamento do sistema antioxidativo enzimático, entre as quais se destacam a redutase do monodesidroascorbato (MDHAR; E.C. 1.6.5.4), a redutase do desidroascorbato (DHAR; E.C. 1.8.5.1) e a redutase da glutathiona (GR; E.C. 1.8.1.7), que juntamente com a APX, compõem o ciclo ascorbato-glutathiona (ASC-GSH) (FOYER; NOCTOR, 2003; GILL; TUTEJA, 2010).

A SOD é uma metalo-proteína responsável pela dismutação enzimática do radical  $\bullet\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ , sendo considerada a primeira linha de defesa das plantas contra o estresse oxidativo, e é encontrada em todos os sítios de produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Em plantas superiores, a SOD apresenta-se na forma de três isoenzimas, que são classificadas de acordo com o íon metálico no grupo prostético, a saber, Cu/Zn-SOD (presente nos cloroplastos e no citosol), Mn-SOD (presente nas mitocôndrias e peroxissomos) e Fe-SOD (presente nos cloroplastos) (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; GILL; TUTEJA, 2010). Estudos com várias espécies vegetais mostram que a SOD atua na proteção contra danos oxidativos ocasionados por estresses abióticos. Quando se superexpressou um dos genes da isoenzima Cu/Zn-SOD simultaneamente a um dos genes da CAT ou APX, houve uma maior tolerância das plantas a diferentes tipos de estresse, indicando a importância da ação conjunta da SOD e de outras enzimas eliminadoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na tolerância a estresses ambientais (LEE *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2013)

Nas plantas, a CAT é a principal reguladora dos níveis intracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (FOYER; NOCTOR, 2003). Ela é uma enzima tetrâmera, contendo um grupo heme em cada subunidade (HORVÁTH *et al.*, 2002), e é responsável pela conversão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (MØLLER, 2001). Está localizada predominantemente nos peroxissomos (e glioxissomos) e atua na remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado durante a fotorrespiração e a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos (XIONG; ZHU, 2002), nas quais sua atuação é fundamental, por evitar o acúmulo excessivo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nessas organelas e impedir seu vazamento para outros compartimentos celulares (FOYER; NOCTOR, 2000). Costa *et al.* (2005), estudando dois genótipos de sorgo com tolerância diferencial ao estresse salino, observaram que a atividade da CAT no genótipo tolerante foi significativamente maior do que no genótipo sensível, levando a inferir sua importância na tolerância ao estresse salino em sorgo. Em contraste, a atividade da CAT em folhas de *Bruguiera parviflora* foi intensamente diminuída pelo estresse salino (PARIDA;

DAS; MOHANTY, 2004). Isso indica que a atividade dessa enzima é modulada diferentemente entre as espécies, em condições de salinidade.

A APX, uma peroxidase da classe I que utiliza especificamente o ascorbato (ASC) como doador de elétrons, é um dos principais antioxidantes celulares envolvidos na eliminação do  $H_2O_2$ , protegendo as células contra os efeitos nocivos dessa ROS (FOYER; NOCTOR, 2005; JALEEL *et al.*, 2009). Ela está presente em diversos compartimentos celulares, tais como citosol, cloroplastos, glioxissomos, mitocôndrias e peroxissomos (SHIGEOKA *et al.*, 2002). Há diferentes isoenzimas de APX nas plantas, podendo ser solúveis, como as encontradas no citosol e estroma, ou associadas às membranas, como aquelas presentes nos microcorpos, tilacoides e mitocôndrias (ASADA, 1992; GILL; TUTEJA, 2010). A atividade da APX está interligada à atividade da CAT e de outras peroxidases. Em plantas de arroz cujos genes das isoformas citosólicas da APX foram silenciados, houve um aumento na expressão gênica e na atividade da CAT, da GPX e da G-POD em condições de estresse abiótico, compensando assim a ausência da APX e mantendo o  $H_2O_2$  em concentrações adequadas (BONIFÁCIO *et al.*, 2011).

As enzimas GPX e PrxR são proteínas relacionadas entre si, que são classificadas como peroxidases dependentes de tiol e amplamente encontradas em todos os reinos (BECANA *et al.*, 2010). Tais peroxidases são definidas como enzimas que dismutam o  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$ , utilizando compostos tióis como agentes redutores (doadores de elétrons), e a especificidade delas por um dado substrato é o que as diferencia: enquanto a GPX utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como doadora de elétrons, na PrxR, esse papel é exercido pela tioredoxina (BECANA *et al.*, 2010). Elas são codificadas por uma família multigênica e as isoenzimas correspondentes encontram-se distribuídas em vários compartimentos celulares, tais como citosol, cloroplastos e mitocôndrias (BECANA *et al.* 2010). Tanto a GPX quanto a PrxR não contêm qualquer grupo prostético, e sua atividade é mediada por um ou dois resíduos de cisteína (Cys) presentes no sítio ativo. Durante a catálise, o grupo sulfidríla da Cys é oxidado pelo hidróperóxido, produzindo ácido sulfênico (Cys-S-OH), com consequente liberação de  $H_2O$ . Em seguida um composto tiol ataca o ácido sulfênico ligado, produzindo uma segunda molécula de  $H_2O$  e formando uma ponte dissulfeto com o resíduo de Cys, a qual sofre então ataque de um segundo composto tiol, regenerando o resíduo de Cys reduzido (DIETZ, 2003; TRIPATHI; BHATI; DIETZ, 2009). Embora a participação da GPX e da PrxR na eliminação de  $H_2O_2$  em plantas não estressadas seja evidente, ainda são necessários mais estudos esclarecedores do papel delas em condições de estresse. Em um estudo com plantas transgênicas de fumo, foi observado que a superexpressão de um ou mais

genes da GPX aumentou a capacidade antioxidante das plantas e, conseqüentemente, conferiu uma maior tolerância a diferentes estresses abióticos (YOSHIMURA *et al.*, 2004). Já em *Tamarix hispida*, a expressão da PrxR variou com o órgão analisado e foi modulada diferencialmente por vários estresses abióticos, denotando que a regulação da expressão dos genes dessa enzima é complexa (GAO *et al.*, 2012).

Como mencionado, a eliminação do  $H_2O_2$  pela APX, à custa do ASC como agente redutor, produz monodesidroascorbato (MDHA) e, dada a importância do ASC em diversos processos celulares, é preciso que ele seja regenerado, a fim de que seu *pool* seja mantido constante. É nesse contexto que as enzimas MDHAR, DHAR e GR, pertencentes ao ciclo ASC-GSH, encontram-se inseridas.

A MDHAR é uma enzima que contém FAD em sua estrutura (flavoenzima), apresentando-se sob formas solúveis, como as encontradas em cloroplastos (estroma), mitocôndrias e citosol, ou ligadas à membrana, como em peroxissomos (GILL; TUTEJA, 2010; GALLIE, 2013). Ela é a responsável pela redução do MDHA a ASC, a partir de elétrons doados pelo NADH ou pelo NADPH, embora sua afinidade pelo primeiro seja maior (GALLIE, 2013). Adicionalmente, o MDHA pode ser reduzido diretamente por elétrons oriundos da ferredoxina reduzida, sendo esse o principal modo como o ASC é regenerado nos cloroplastos; de fato, a ação da MDHAR nessa organela está limitada a reduzir qualquer molécula de MDHA que tenha escapado à ferredoxina (ASADA, 1999). Apesar de os elétrons da ferredoxina serem disputados também pelo  $NADP^+$ , a proporção com que essa reação ocorre é 34 vezes menor do que com o MDHA (ASADA, 1999; GALLIE, 2013). Se o MDHA não for reduzido por quaisquer dos modos citados, ele sofrerá dismutação, produzindo, a cada duas moléculas de MDHA, uma molécula de ASC e outra de desidroascorbato (DHA) (ASADA, 1999). Convém salientar que o MDHA também pode ser formado no lúmen do tilacoide, porém nesse caso ele invariavelmente sofrerá dismutação, pois, além de essa reação ser favorecida pelo baixo pH do lúmen no período diurno, não há MDHAR ou ferredoxina reduzida nesse ambiente; o DHA formado, portanto, difundir-se-á para o estroma, a fim de ser regenerado a ASC (ASADA, 1999; GALLIE, 2013).

A regeneração do ASC a partir do DHA pode ocorrer através da redução não enzimática do DHA pela GSH, embora a uma velocidade bastante lenta, ou através da enzima DHAR (NOCTOR; FOYER, 1998; ASADA, 1999). Nesse último caso, a DHAR catalisa a reação de duas moléculas de GSH com o DHA, produzindo ASC e glutathiona oxidada (GSSG) — duas moléculas de GSH ligadas entre si por meio de uma ligação dissulfeto (GALLIE, 2013). A DHAR é uma enzima monomérica, presente em cloroplastos (estroma) e

citosol, que pertence à superfamília de transferases da glutathiona, a qual compreende diversas proteínas com estruturas tridimensionais semelhantes e que possuem um domínio de ligação à GSH no seu sítio ativo; uma das características que distinguem a DHAR é o fato de o domínio de ligação nessa enzima ser mediado por um resíduo de Cys, ao invés de serina, como nas outras enzimas dessa classe (DIXON; DAVIS; EDWARDS, 2002; ÖZTETIK, 2008; GALLIE, 2013). Se eventualmente o DHA não for oxidado a ASC, ele sofrerá hidrólise irreversível, produzindo ácido 2,3-dicetogulônico, acarretando diminuição do *pool* de ascorbato e alterações no *status* redox celular desse antioxidante (GALLIE, 2013).

A GSSG formada durante a reação da DHAR precisa ser convertida em GSH novamente, e isso é feito pela enzima GR, a partir de elétrons provenientes do NADPH. A GR é uma enzima homodimérica, que possui uma molécula de FAD como grupo prostético, sendo pertencente, portanto, à família das oxidorreduções flavo-proteicas (GILL; TUTEJA, 2010; YOUSUF *et al.*, 2012). Ela é constituída por subunidades de 55 kDa e localizada predominantemente nos cloroplastos, mas pode ser encontrada nas mitocôndrias e no citosol (GILL; TUTEJA, 2010). O mecanismo cinético da GR é o de pingue-pongue, composto por duas etapas. Na primeira delas, o NADPH transfere dois elétrons para o FAD, produzindo  $\text{NADP}^+$ ; isso modifica a estrutura da enzima, tornando-a apta a reagir com o segundo substrato. Já na segunda etapa, há a produção de duas moléculas de GSH a partir da transferência dos elétrons para a GSSG, no sítio ativo da enzima (YOUSUF *et al.*, 2012). O papel da GR no sistema antioxidativo de defesa contra ROS é essencial, pois ela é responsável por manter o *status* reduzido do *pool* de glutathiona na célula; uma relação GSH/GSSG adequada, além de manter o funcionamento do ciclo ASC-GSH, também contribui para a eliminação de ROS pela ação direta da GSH. Em adição a esses papéis, a reação catalisada pela GR, que é o passo limitante do ciclo ASC-GSH, também aumenta a razão  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , garantindo maior disponibilidade de  $\text{NADP}^+$  nos cloroplastos para aceitar elétrons oriundos da CTE, minimizando assim a formação de  $\bullet\text{O}_2^-$  (AHMAD *et al.*, 2010).

### **1.3.3.3 Mecanismos não enzimáticos de eliminação de ROS**

Os antioxidantes não enzimáticos incluem a GSH e o ASC, bem como o tocoferol, os flavonóides, os alcalóides e os carotenóides. Essas moléculas desempenham um papel-chave na eliminação de ROS nas plantas, doando-lhes elétrons e levando-as a um estado menos nocivo (ASADA, 1999). Segundo Noctor e Foyer (1998), ASC e GSH são os dois

mais importantes antioxidantes não enzimáticos celulares, que, como já mencionado, também atuam como doadores de elétrons no sistema enzimático de eliminação de ROS.

A glutathiona é um tripeptídeo ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) existente sob as formas reduzida e oxidada, que é encontrado em diversos compartimentos celulares, tais como cloroplastos, citosol, mitocôndrias, retículo endoplasmático e vacúolo (AHMAD *et al.*, 2010). Certas espécies vegetais possuem compostos homólogos a GSH, em que o resíduo de glicina na extremidade C-terminal é substituído por outros aminoácidos, por exemplo, alanina e serina, produzindo respectivamente homoglutationa e hidroximetilglutationa (NOCTOR; FOYER, 1998).

A síntese de glutathiona ocorre no citosol ou nos cloroplastos, em duas etapas dependentes de ATP. Primeiramente, a enzima ligase do glutamato-cisteína (GCL; E.C. 6.3.2.2) catalisa a formação de  $\gamma$ -glutamil-cisteína, a partir dos aminoácidos glutamato (Glu) e Cys; nesse caso a ligação peptídica ocorre entre os grupos  $\gamma$ -carboxil do Glu e  $\alpha$ -amino da Cys. Em seguida, a enzima sintetase da glutathiona (E.C. 6.3.2.3) adiciona o aminoácido glicina (Gly) ao dipeptídeo  $\gamma$ -glutamil-cisteína, completando o tripeptídeo. A biossíntese de glutathiona é regulada principalmente pela disponibilidade de Cys como substrato para a GCL, bem como pela atividade dessa enzima, que corresponde ao passo limitante da via (NOCTOR; FOYER, 1998; NOCTOR *et al.*, 2002).

A glutathiona e seus derivados são a principal fonte não proteica de grupos tióis, e a alta reatividade deles com diferentes compostos eletrofilicos torna esses compostos capazes de exercer funções distintas na célula. Nas plantas, as funções da glutathiona são classificadas em duas categorias: aquelas relacionadas ao metabolismo do enxofre e aquelas relacionadas à defesa vegetal. Entre os processos em que a GSH está envolvida, destacam-se: a) absorção e assimilação de enxofre na raiz, em que ela age como molécula reguladora; b) desintoxicação celular, através de sua conjugação a compostos xenobióticos, mediada pelas enzimas transferases da glutathiona; c) síntese de fitoquelatinas, oligômeros de glutathiona responsáveis pela quelação de metais pesados; d) eliminação de ROS, de forma direta ou indireta (como substratos de enzimas antioxidantes e atuando no ciclo ASC-GSH); e) controle do *status* redox celular, em conjunto com ascorbato (NOCTOR; FOYER, 1998; NOCTOR *et al.*, 2002; ÖZTETIK, 2008; FOYER; NOCTOR, 2009; AHMAD *et al.*, 2010; FOYER; NOCTOR, 2011).

O ascorbato é o mais abundante antioxidante celular, estando presente em todas as partes da planta, embora sua concentração seja bastante elevada nos tecidos em que ocorre a fotossíntese, nos meristemas e em certos frutos (GILL; TUTEJA, 2010). Ele é encontrado

principalmente nos cloroplastos, sob a forma reduzida (ASC), alcançando concentrações de até 50 mM no estroma.

Nas plantas, o ascorbato é sintetizado a partir de quatro precursores possíveis, cada um deles representando uma via biossintética distinta: i) D-manose/L-galactose; ii) L-gulose; iii) D-galacturonato; e iv) *myo*-inositol (SMIRNOFF, 2011). Entre essas vias, a da D-manose/L-galactose é a que mais contribui para a síntese do ASC, através de uma série de reações que compreendem a conversão de D-manose-6-fosfato a L-galactose (seis passos enzimáticos envolvidos), a oxidação da L-galactose a L-galactono-1,4-lactona (precursor imediato do ascorbato), e a oxidação da L-galactono-1,4-lactona a ascorbato (SMIRNOFF, 2011; GALLIE, 2013). Todos os passos enzimáticos dessa via ocorrem no citosol, à exceção do último, que ocorre nas mitocôndrias (MILLAR *et al.*, 2003; NOCTOR, 2006; SMIRNOFF, 2011).

O ASC possui diversas funções nas células, entre as quais se destacam: a) antioxidante, seja atuando diretamente na remoção de ROS, seja indiretamente, através do ciclo ASC-GSH; b) doador de elétrons, por exemplo, nas reações do ciclo das xantofilas, bem como à CTE de mitocôndrias e cloroplastos; c) regulador dos processos de divisão e expansão celulares; d) controle do *status* redox celular, em conjunto com glutathiona (SMIRNOFF, 2011; GALLIE, 2013).

#### ***1.3.4 Aclimação ao estresse salino***

A sobrevivência de uma planta sob estresse depende da sua capacidade de se aclimatar a essa condição adversa. A aclimação é um processo que envolve mudanças fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, inclusive na expressão gênica, que não são transmitidas para as gerações futuras (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010), permitindo que um indivíduo adquira maior resistência ao estresse, em comparação àqueles que não se encontram aclimatados. Quando a aclimação a um determinado estresse é intensificada pela exposição a um estresse anterior (de mesmo tipo ou diferente), têm-se a tolerância cruzada.

Embora seja possível conseguir plantas transgênicas tolerantes à salinidade, isso não vem sendo utilizado em larga escala (MUNNS, 2005; COMINELLI *et al.*, 2013). A complexidade dos mecanismos de tolerância, que por vezes é uma característica multigênica, e a diversidade das respostas das plantas aos estresses têm contribuído para esse insucesso (ASHRAF *et al.*, 2008). Nas condições de campo, as plantas estão submetidas frequentemente a estresses múltiplos, os quais variam em intensidade e duração, afetando diferencialmente o

desempenho delas, o qual dependerá ainda do estágio de desenvolvimento em que elas se encontrem (COMINELLI *et al.*, 2013). É nesse contexto que a tolerância cruzada torna-se importante, principalmente para a agricultura, pois, através desse processo, as plantas podem ser selecionadas por tolerarem mais de um tipo de estresse (AZEVEDO-NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008).

Uma das técnicas utilizadas para aumentar a aclimatação a estresses abióticos é a aplicação de compostos orgânicos, inorgânicos ou reguladores do crescimento no meio de cultivo das plantas, sendo as raízes, nesse caso, o órgão que entra em contato com a substância, ou por aspersão desses compostos nas folhas (ASHRAF *et al.*, 2008). Pode-se citar também o uso de substâncias que, dependendo da sua concentração, ora atuam como indutores de estresse, ora como moléculas sinalizadoras; o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o óxido nítrico (NO) são exemplos disso (FILIPPOU *et al.*, 2013). Em todos esses casos, as plantas podem ser mantidas na presença dessas substâncias exógenas durante todo o desenvolvimento delas, ou apenas em um período que antecede a exposição ao estresse (pré-tratamento). Uma alternativa para induzir aclimatação é o uso desses compostos já mencionados no tratamento das sementes, antes da semeadura (ASHRAF *et al.*, 2008), visando obter uma germinação rápida e um estande de plântulas uniforme; se os efeitos nocivos do estresse puderem ser atenuados nos estádios iniciais do desenvolvimento, as chances da planta estabelecer-se com sucesso são consideravelmente aumentadas (ASHRAF; FOOLAD, 2005).

As evidências de que essa abordagem condiciona as plantas a responderem mais rápida e eficientemente a estresses múltiplos são cada vez mais concretas. A aplicação foliar de glicinabetaína, por exemplo, elevou os teores desse soluto compatível nas folhas de plantas de trigo submetidas a estresse salino, contribuindo, assim, para um melhor ajustamento osmótico nesses tecidos (RAZA *et al.*, 2007). Além disso, nesse mesmo estudo, a aplicação desse composto orgânico aumentou a atividade das enzimas do sistema antioxidativo no cultivar sensível à salinidade, capacitando-o a sobreviver melhor nessa condição de estresse. Tuna *et al.* (2008) observaram que a redução dos teores de macro e micronutrientes de plantas de milho, causada pela salinidade, foi atenuada em razão da aplicação prévia de ácido giberélico. O pré-tratamento de sementes de trigo (WAHID *et al.*, 2007) e milho (GONDIM *et al.*, 2010) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou a tolerância das plantas à salinidade através da redução dos teores de íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> na planta e do aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidativo.

A aclimatação a um dado estresse é mediada por mudanças intensas na expressão gênica, modificando o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma das plantas (KOSOVÁ *et*

*al.*, 2011). Sabe-se que mudanças na transcrição gênica nem sempre correspondem a mudanças no proteoma; sendo assim, estudar as alterações no proteoma durante a aclimação é significativa, uma vez que as proteínas são os efetores diretos das respostas das plantas a estresses. Tais alterações podem envolver enzimas, componentes da maquinaria de transcrição e tradução, bem como proteínas da membrana plasmática e do citoesqueleto (KOSOVÁ *et al.*, 2011).

### 1.3.5 Óxido nítrico

Em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão, o óxido nítrico (NO) é um gás, apresentando solubilidade moderada em água (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005). Por apresentar um elétron desemparelhado, é também um radical livre bastante reativo, com uma meia-vida relativamente longa (3 a 5 segundos), em comparação a outros radicais; devido a seu alto coeficiente de difusão e a seu tamanho pequeno, consegue alcançar facilmente tanto regiões hidrofílicas (citosol), quanto regiões hidrofóbicas (bicamada lipídica das membranas) da célula (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Na presença de O<sub>2</sub>, o NO pode formar outros óxidos de nitrogênio (NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), os quais reagem diretamente com grupos amina na célula ou são hidrolisados a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Além disso, o NO reage rapidamente com o radical <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>, formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), o qual, em pH neutro, rapidamente sofre protonação, formando o ácido peroxinitroso (HONO<sub>2</sub>). Este, por sua vez, é instável e se decompõe rapidamente por duas maneiras distintas, produzindo NO<sub>2</sub> e HO<sup>•</sup> ou íons NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Fica evidente, portanto, que a produção de peroxinitrito, ácido peroxinitroso e seus produtos de decomposição é extremamente danosa às células (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005). Tais espécies podem reagir com grupos tióis de proteínas ou com radicais poli-insaturados de ácidos graxos de lipídios de membrana, danificando essas biomoléculas (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Nas plantas, o NO pode ser sintetizado de três formas diferentes: i) a partir da atividade da enzima redutase do nitrato, que pode catalisar a conversão de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO, à custa de NADPH; ii) pela ação da enzima sintase do NO, que converte arginina a citrulina e NO; e iii) espontaneamente, através da conversão de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO, em meio acidificado ou da reação entre óxidos de nitrogênio e metabólitos da planta (CRAWFORD, 2006; ARASIMOWICZ;

FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007; BETHKE; LIBOUREL; JONES, 2007; QIAO; FAN, 2008).

Devido a suas propriedades químicas, o NO pode interagir prontamente com metais de transição (Fe, Cu e Zn, por exemplo), especialmente aqueles que compõem as metaloproteínas. Um segundo modo de interação do NO é através da nitração de resíduos de tirosina, resultando, portanto, na adição de um grupo nitro (NO<sub>2</sub>) à proteína. Por fim, o modo mais estudado é a *S*-nitrosilação, em que o NO liga-se covalentemente a um grupo tiol de um resíduo de Cys de uma proteína-alvo. De modo geral, tais interações induzem mudanças conformacionais que influenciam a reatividade e a funcionalidade dessas proteínas-alvo (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007; ASTIER; LINDERMAYR, 2012).

O NPS e outros compostos relacionados, tais como o *S*-nitrosoglutationa (GSNO) e o *S*-nitroso-*N*-acetil-penicilamina (SNAP), vêm sendo amplamente utilizados em experimentos que visam estudar o papel fisiológico do NO nas plantas, em especial, naqueles em que se avalia a indução de aclimatação e tolerância a estresses abióticos (QIAO; FAN, 2008; SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011). Tais compostos são considerados liberadores de NO, quando solubilizados, sendo capazes de induzir respostas semelhantes àquelas mediadas pelo NO endógeno (FLORYSZAK-WIECZOREK *et al.*, 2006). Os efeitos do NO nas plantas são dependentes de sua concentração e do tecido onde ele está localizado (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011). Por exemplo, o NO, quando em baixas concentrações, é capaz de agir como molécula sinalizadora, além de eliminar o  $\cdot\text{O}_2^-$ , como já mencionado, mas em altas concentrações pode causar danos à célula, seja de modo direto, devido a sua reatividade, seja por contribuir para a ação desenfreada de agentes oxidantes (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que o NO é uma molécula importante nos processos de sinalização celular, atuando de modo sinérgico com outros sinalizadores, tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido salicílico, Ca<sup>2+</sup> e GMP cíclico (QIAO; FAN, 2008). Entre os processos fisiológicos vegetais nos quais o NO está envolvido, destacam-se a promoção da germinação, a quebra da dormência de sementes, a regulação da maturação, da senescência e da regulação floral, a mediação da abertura estomática (juntamente ao ácido abscísico), o gravitropismo e as respostas aos estresses bióticos e abióticos (BESSION-BARD; PUGIN; WENDEHENNE, 2008; QIAO; FAN, 2008; SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011).

### **1.3.5.1 Aclimação a estresses mediada pelo óxido nítrico**

A aplicação de NO (ou, mais precisamente, de compostos que liberam NO) induziu a aclimação das plantas aos estresses salino (UCHIDA *et al.*, 2002), hídrico (GARCÍA-MATA; LAMATTINA, 2001) e o causado por metais pesados (HU *et al.*, 2007) e isso esteve relacionado com a capacidade de o NO manter os níveis de ROS baixos e de aumentar a atividade das enzimas do sistema antioxidativo, através de mudanças na transcrição dos genes relacionados a elas (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011). Efeitos similares foram observados quando os compostos liberadores de NO foram empregados nas sementes, resultando na melhora da germinação em condições de estresse abiótico (KOPYRA; GWÓZDŹ, 2003; HU *et al.*, 2007). Nessas abordagens, o NO funciona tanto como molécula sinalizadora, quanto como um agente indutor de tolerância cruzada.

### **1.3.6 O milho**

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta anual, herbácea, pertencente à família Poaceae e adaptada às mais diversas condições ecológicas (DUARTE, 2000). É originalmente tropical, sendo provavelmente a mais importante planta cultivada com origem nas Américas e um dos mais importantes produtos do setor agrícola no Brasil (DUARTE, 2000). Sua importância é justificada tanto por sua intensa utilização na alimentação animal (diretamente ou na fabricação de rações), quanto na indústria de alta tecnologia (produção de filmes e embalagens biodegradáveis), bem como por seu valor nutricional. Cerca de 70% da produção mundial de milho destina-se à alimentação animal, podendo esse percentual chegar a 85% em países desenvolvidos, enquanto apenas 15% de toda a produção mundial são destinados ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES *et al.*, 2006). No entanto, em muitas áreas do mundo, a sua produtividade é limitada, devido a certas condições estressantes, como a salinização do solo e da água de irrigação (HICHEM *et al.*, 2009). O milho é uma cultura considerada moderadamente sensível à salinidade, que começa a ser afetada a partir de 1,6 dS m<sup>-1</sup>, embora esse efeito varie entre os diferentes cultivares existentes (MASS; HOFFMAN, 1977). Portanto, dada a importância econômica do milho e sua relativa sensibilidade aos sais, o estudo dos efeitos do NO na indução de sua aclimação à salinidade torna-se relevante.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Experimento I – Escolha da concentração de NPS adequada para o pré-tratamento das plantas de milho

#### 2.1.1 Semeadura, condições de cultivo e tratamentos

Sementes de milho (*Zea mays* L.), variedade BR 5011, foram inicialmente desinfestadas com solução de NaClO a 1%, por 10 min. Após esse tempo, elas foram lavadas com água destilada e, em seguida, semeadas em copos plásticos contendo vermiculita umedecida com água destilada. Aos sete dias após a semeadura, as plântulas foram transferidas para bandejas de plástico contendo 10 L de solução nutritiva de Hoagland a 50% (HOAGLAND; ARNON, 1950), onde permaneceram por cinco dias, para se aclimatarem. Decorrido esse tempo, iniciou-se o pré-tratamento com NPS, o qual constou do cultivo das plantas em solução nutritiva de Hoagland a 25% acrescida de NPS a 0, 50, 75, 100 ou 200  $\mu\text{M}$ .

Ao término de 48 h, as plantas pré-tratadas foram transferidas para baldes plásticos contendo 6 L de solução nutritiva de Hoagland a 50% (duas plantas por balde), ocasião na qual se iniciou a adição de NaCl, que foi feita em parcelas de 40 mM por dia, até atingir a concentração de 80 mM. Em cada grupo de plantas pré-tratadas, metade delas permaneceu na ausência de NaCl, constituindo assim o tratamento controle (NaCl a 0 mM).

Todas as etapas de cultivo das plantas foram realizadas em casa de vegetação, onde os valores médios da temperatura diurna e noturna e da umidade relativa do ar foram respectivamente  $31,1 \pm 0,9$  °C,  $25,4 \pm 1,1$  °C e 65,5%. Durante o pré-tratamento, as soluções nutritivas foram trocadas a cada 12 h, a fim de minimizar a redução da concentração de NPS decorrente da sua decomposição; a troca das soluções nutritivas durante o tratamento salino, por sua vez, ocorreu a cada quatro dias, e o volume perdido por evapotranspiração foi repostado diariamente pela adição de água destilada. Em todos os casos, o pH das soluções foi mantido próximo de 5,5.

#### 2.1.2 Coleta das plantas e análise do crescimento

As plantas foram coletadas após sete dias sob estresse salino, sendo divididas em folhas, colmos e raízes. Nessa ocasião, foi determinada a área foliar (AF), por meio de um

medidor de área foliar (LI-COR, Inc., modelo LI-3000). A primeira folha completamente expandida, a contar do ápice, e parte do terço distal das raízes foram reservadas para a determinação do vazamento de eletrólitos. Em seguida, determinou-se a massa fresca das folhas e raízes restantes, as quais foram juntadas aos colmos e mantidas em estufa com circulação forçada de ar, a 60 °C, por 72 h. Após a secagem, determinou-se a massa seca da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e a total (MST), levando-se em consideração a massa retirada inicialmente. O material vegetal foi então macerado em almofariz, com auxílio de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó, o qual foi utilizado para a determinação dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ .

### **2.1.3 Teores de $\text{Na}^+$ e $\text{K}^+$**

Os teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram determinados por fotometria de chama. O extrato empregado nessas determinações foi preparado segundo Cataldo *et al.* (1975), com pequenas modificações. Após a adição de água desionizada a 50 mg do pó seco da parte aérea (folhas + colmo) e raízes, seguiu-se à incubação em banho-maria a 45 °C, por 1 h, com agitações a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $5.000 \times g$ , por 15 min, e o sobrenadante resultante foi coletado e filtrado em papel de filtro.

### **2.1.4 Vazamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios**

O vazamento de eletrólitos (VE) nas folhas e nas raízes de milho foi avaliado após a respectiva incubação de 10 discos foliares (1 cm de diâmetro), retirados da primeira folha completamente expandida, e de cerca de 100 mg do terço distal da raiz em água desionizada, a 25 °C, por 6 h. Decorrido esse tempo, a condutividade elétrica inicial ( $\text{CE}_1$ ) do meio foi medida, com auxílio de um condutivímetro (Micronal, modelo AJX-515), e, logo após, as amostras foram incubadas em banho-maria a 95 °C, por 30 min. Após alcançarem a temperatura ambiente novamente, a condutividade elétrica final ( $\text{CE}_2$ ) foi medida. O VE foi estimado através da seguinte equação:  $\text{VE} = (\text{CE}_1/\text{CE}_2) \times 100$  (SINGH *et al.*, 2007).

A peroxidação dos lipídios de membrana foi mensurada através do teste para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), proposto por Heath e Packer (1968). O extrato utilizado nessa determinação foi obtido após pulverização de cerca de 250 mg do tecido fresco da F1 e do terço distal da raiz com nitrogênio líquido, seguida por maceração, a 4 °C, com ácido tricloroacético (TCA, do

inglês *Trichloroacetic acid*) a 5%. Logo após, o homogeneizado foi centrifugado a  $12.000 \times g$ , por 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante, imediatamente utilizado nas análises referidas (HEATH; PACKER, 1968). Os teores de TBARS foram estimados após a subtração entre leituras de absorvância em 532 nm e 600 nm e utilizando-se seu coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 0,155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### **2.1.5 Análise estatística**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial: [2 (níveis de estresse salino) x 5 (concentrações de NPS)]. Cada tratamento foi formado por cinco repetições, que, por sua vez, foram constituídas por duas plantas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste *F* de Snedecor;  $P \leq 0,05$ ) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). A fim de se analisar o efeito global do pré-tratamento com NPS sobre as plantas de milho, seja nas condições controle, seja nas condições salinas, todos os valores observados para cada variável foram plotados em um gráfico de radar, tomando-se como referência os valores obtidos na ausência de pré-tratamento (NPS a 0  $\mu\text{M}$ ).

## **2.2 Experimento II – Aclimação à salinidade mediada pelo pré-tratamento com NPS a 75 $\mu\text{M}$**

### **2.2.1 Semeadura, condições de cultivo e tratamentos**

Os procedimentos relacionados à sementeira e ao cultivo inicial das plantas foram realizados conforme descrito no item 2.1.1. Após o período de aclimação em solução nutritiva, deu-se início ao pré-tratamento das plantas com NPS a 75  $\mu\text{M}$ , o qual foi aplicado no meio de cultivo (solução nutritiva de Hoagland a 25%). Ao término de 48 h, as plantas pré-tratadas foram transferidas para baldes plásticos contendo 3 L de solução nutritiva de Hoagland a 50% (uma planta por balde), e então se iniciou o tratamento salino, conforme descrito no item 2.1.1. As condições de cultivo das plantas durante o período experimental restante, assim como o manejo das soluções nutritivas, também se deram como descrito anteriormente.

### **2.2.2 Trocas gasosas, coleta das plantas e análise do crescimento**

As plantas foram coletadas após 7 e 14 dias do início da aplicação de NaCl. Antes de cada coleta, foram determinados os parâmetros de trocas gasosas [condutância estomática ( $g_s$ ), fotossíntese líquida ( $A$ ), transpiração ( $E$ ) e concentração interna de  $CO_2$  ( $C_i$ )] na primeira folha completamente expandida, a contar do ápice, bem como o déficit de pressão de vapor (DPV) entre a folha e o ar adjacente a ela, utilizando-se um analisador de gás no infravermelho (IRGA, mod. LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, USA). Com base nos valores de  $A$  e  $C_i$ , determinou-se ainda a eficiência de carboxilação das plantas ( $A/C_i$ ).

Na ocasião das coletas, as plantas foram divididas em folhas, colmo e raiz, e se determinou a AF das plantas, por meio de um medidor de área foliar (modelo LI-3000, LI-COR, Lincoln, USA). A primeira e a segunda folhas completamente expandidas, a contar do ápice, e o terço distal da raiz foram reservados para as análises bioquímicas e, sequencialmente, congelados com nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . O restante das folhas e da raiz, juntamente com os colmos, foi liofilizado; após esse processo, determinou-se a MSPA, a MSR e a MST, levando-se em consideração a massa retirada inicialmente. O material vegetal seco foi então macerado até a obtenção de um pó, o qual foi armazenado até sua utilização.

### **2.2.3 Análises minerais**

A extração dos elementos Na, K, Ca, Mg, P e S foi realizada segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Em tubos de digestão, foram adicionados 0,5 g do pó liofilizado de folhas, colmo ou raiz e 6,0 mL da mistura entre ácido nítrico ( $HNO_3$ ) e ácido perclórico ( $HClO_4$ ), na proporção 2:1 (v/v). Os tubos foram então colocados em um bloco digestor [modelo MA 4025, Marconi<sup>®</sup> (Piracicaba, SP, Brasil)], cuja temperatura foi gradativamente elevada até  $160\text{ }^\circ\text{C}$ , ocasião na qual permaneceram até o volume ser reduzido à metade. Alcançada essa situação, a temperatura foi então aumentada para  $250\text{ }^\circ\text{C}$ , na qual os tubos foram mantidos até o extrato tornar-se incolor e sem resquícios de material não digerido. Após os tubos retornarem à temperatura ambiente, o volume dos extratos foi aferido para 50 mL com água desionizada, em balão volumétrico.

Os teores de Na e K foram determinados por fotometria de chama, ao passo que os de Ca e Mg foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. Já os teores de P foram determinados segundo Braga e Defelipo (1974), com pequenas modificações,

através de leituras de absorvância em 660 nm, e tendo como base uma curva padrão ajustada a partir de soluções com concentrações crescentes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Os teores de S, por sua vez, foram estimados por turbidimetria com cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ), através de leituras de absorvância em 440 nm e tendo como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

A extração e a determinação dos teores de N foram realizadas segundo Baethgen e Alley (1989). Cerca de 50 mg do pó liofilizado de folhas, colmo ou raiz foi colocado em tubos de digestão contendo 1,11 g da mistura catalisadora [sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), sulfato de zinco ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e selênio em pó (Se), na proporção de 1:0,1:0,01 (p/p)], juntamente com 2,0 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado. Em seguida, os tubos foram colocados em um bloco digestor [Marconi<sup>®</sup>, modelo MA 4025 (Piracicaba, São Paulo, Brasil)], no qual a temperatura foi elevada gradualmente até 350°C, a fim de que se processasse a mineralização das amostras. Ao final desse processo, quando os extratos já se apresentavam como uma solução de cor verde e sem resíduos de material não digerido, cada tubo teve volume aferido com água desionizada para 25 mL, em balão volumétrico. Os teores de N foram estimados através de leituras de absorvância em 650 nm e tendo como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (BAETHGEN; ALLEY, 1989).

O extrato empregado para a determinação dos teores de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{NO}_3^-$  foi preparado segundo Cataldo *et al.* (1975), com pequenas modificações. Após a adição de água desionizada a 50 mg do pó liofilizado de folhas, colmo ou raiz, seguiu-se à incubação em banho-maria a 45 °C, por 1 h, com agitações a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $5.000 \times g$ , por 15 min, e o sobrenadante resultante foi coletado e filtrado em papel de filtro. Os teores de  $\text{Cl}^-$  foram determinados conforme Gaines, Parker e Gascho (1984), através de leituras de absorvância em 460 nm e tendo como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de NaCl. Já os teores de  $\text{NO}_3^-$  foram determinados conforme Cataldo *et al.* (1975), através de leituras de absorvância em 410 nm e tendo como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de  $\text{KNO}_3$ .

De posse dos teores de cada elemento mineral, foram calculadas as eficiências de absorção (EA) e de transporte (ET), de acordo com as seguintes fórmulas: a)  $\text{EA} = (\text{conteúdo do nutriente na planta})/(\text{massa seca das raízes})$  (SWIADER; CHYAN; FREIJI, 1994); b)  $\text{ET} = (\text{conteúdo do nutriente na parte aérea})/(\text{conteúdo do nutriente na planta})$  (LI; McKEAND; ALLEN, 1991).

#### 2.2.4 Vazamento de eletrólitos, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas

O VE e a peroxidação de lipídios foram determinados semelhantemente ao descrito no item 2.1.4. Os teores de proteínas oxidadas foram mensurados através da reação de grupos carbonila com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH), como descrito por Reznick e Packer (1994). O extrato utilizado nesta determinação foi obtido após pulverização de 250 mg do tecido fresco de folhas (primeira completamente expandida) ou raiz com nitrogênio líquido, seguida por homogeneização a 4 °C com solução-tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,4, contendo PMSF a 2 mM e EDTA a 1 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a  $6.000 \times g$ , por 10 min, e o sobrenadante foi utilizado nas análises. Os teores de proteínas oxidadas foram calculados usando o coeficiente de extinção molar do DNFH ( $\epsilon = 2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), após leituras de absorbância em 390 nm (REZNICK; PACKER, 1994).

#### 2.2.5 Teores de $\text{H}_2\text{O}_2$ e $\cdot\text{O}_2^-$

O extrato utilizado para a determinação dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi obtido após pulverização de 200 mg do tecido fresco de folhas (segunda completamente expandida) ou raiz com nitrogênio líquido, seguida por homogeneização a 4 °C com solução-tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 6,4, contendo KCN a 5 mM (CHEESEMAN *et al.*, 2006). Em seguida os homogeneizados foram centrifugados a  $12.000 \times g$ , por 15 min, e o sobrenadante, utilizado na análise. Os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram estimados como descrito por Gay, Collins e Gebicki (1999), através de leituras de absorbância em 560 nm, em decorrência da reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o alaranjado de xilenol, e tendo como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A obtenção dos extratos para a determinação dos teores de  $\cdot\text{O}_2^-$  foi de modo idêntico àquela para a determinação dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , à exceção da solução extratora, que foi tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8 (XU *et al.*, 2010). Os teores de  $\cdot\text{O}_2^-$  foram determinados conforme Elstner e Heupel (1976), através de leituras de absorbância em 530 nm, decorrentes da formação de um composto azo ao final da reação (estequiometricamente equivalente ao  $\cdot\text{O}_2^-$ ), e tendo como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de  $\text{NaNO}_2$ .

### 2.2.6 Teores de ascorbato e glutatona

O ascorbato e a glutatona foram extraídos mediante a pulverização de 250 mg de folhas (segunda completamente expandida) ou raiz com nitrogênio líquido, seguida pela homogeneização com solução de ácido tricloroacético (TCA) a 5% (m/v), a 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $12.000 \times g$ , por 15 min, e o sobrenadante, coletado.

A determinação dos teores de ascorbato total [(ASC + DHA; O DHA foi reduzido a ASC devido à presença de ditiotreitól (DTT)] foi feita através de leituras de absorvância em 525 nm, em decorrência da formação de um complexo entre biperidil e o íon  $Fe^{2+}$ , sendo este último resultante da redução do  $Fe^{3+}$  pelo ascorbato presente no meio de reação (LAW; CHARLES; HALLIWELL, 1983). Adotou-se esse mesmo procedimento para a determinação de ASC, diferindo apenas quanto ao DTT, que esteve ausente nesse caso. Nas duas determinações, teve-se como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de ácido ascórbico (LAW *et al.*, 1983). Os teores de DHA foram obtidos pela diferença entre os de ascorbato total e os de ASC. O *status* redox do ascorbato foi determinado pela razão entre ASC e o ascorbato total (ASC + DHA).

Os teores de glutatona total (GSH + GSSG; a GSSG presente no extrato foi inicialmente reduzida a GSH pela ação da enzima GR) foram determinados através de leituras de absorvância em 412 nm, resultantes da reação da GSH com o DTNB [ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzóico)], e usando-se o coeficiente de extinção molar para o TNB ( $\epsilon = 0,1415 M^{-1} cm^{-1}$ ), que é produto desta reação (GRIFFITH, 1980). Esse mesmo procedimento foi adotado para a determinação de GSH, diferindo apenas pela ausência de GR (GRIFFITH, 1980). Finalmente, os teores de GSSG foram determinados pela diferença entre os de glutatona total e GSSG, e o *status* redox da glutatona foi expresso pela razão entre GSH e a glutatona total (GSH + GSSG).

### 2.2.7 Enzimas antioxidantes

O extrato para a determinação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX foi obtido a partir da homogeneização em almofariz, a 4 °C, de 100 mg do pó liofilizado de folhas e raiz com solução-tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM. Para a extração da APX, a solução-tampão conteve, adicionalmente, ascorbato a 2 mM. O homogeneizado foi centrifugado a  $12.000 \times g$ , a 4 °C, durante 15 min, e o sobrenadante resultante foi coletado e utilizado nas atividades.

A atividade da SOD foi mensurada por leituras de absorvância em 560 nm, devido à produção de azul de formazana, resultante da fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRICOVICH, 1971); considerou-se 1 unidade de atividade (UA) a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT. A atividade da CAT foi determinada de acordo com Havir e McHale (1987), através do decréscimo da absorvância em 240 nm, devido ao consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e usando seu coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Por fim, determinou-se a atividade da APX conforme Nakano e Asada (1981), mediante o acompanhamento da oxidação do ascorbato, através da redução da absorvância em 290 nm, levando-se em consideração seu coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 0,0028 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e a estequiometria da reação (dois moles de ascorbato para um de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

## **2.2.8 Análises proteômicas**

### **2.2.8.1 Extração das proteínas**

A extração das proteínas foi realizada como descrito por Sarma, Oerle e Emerich (2008), com algumas modificações. Cerca de 250 mg do pó liofilizado de folhas e raiz foram homogeneizados em almofariz com 8 mL de solução-tampão Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0, contendo EDTA a 10 mM, DTT a 50 mM e PMSF a 1 mM. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a  $8.000 \times g$ , durante 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, foram adicionados 5 mL de fenol tamponado (pH 8,0) ao precipitado resultante nos tubos, os quais foram mantidos sob agitação constante por 1 h, a 4 °C. Decorrido esse tempo, procedeu-se a uma nova centrifugação, sob as mesmas condições de antes, e a fração aquosa resultante (superior) foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 5 mL de fenol tamponado, sendo mantidos sob agitação à temperatura ambiente, por 20 min, a fim de se reextrair quaisquer proteínas que tivessem restado na fração aquosa. Após isso, as amostras foram centrifugadas a  $8.000 \times g$ , durante 20 min, a 4 °C, e a fase fenólica (inferior) resultante foi unida à primeira.

Em cada amostra oriunda da união das frações fenólicas, foram adicionados 7 mL de solução-tampão Tris HCl a 100 mM, pH 8,0, contendo DTT a 10 mM, sendo em seguida mantida sob agitação constante a 4 °C, por 10 min, e ao final, centrifugadas durante 20 min a  $8.000 \times g$ , a 4 °C. Após a centrifugação, a fase aquosa (superior) foi descartada e, à fase fenólica (inferior), foram adicionados 25 mL de solução gelada de acetato de amônio a 0,1 M, preparada em metanol absoluto, contendo DTT a 10 mM, sendo então mantido *overnight* a -

80 °C, para que as proteínas extraídas precipitassem. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a  $8.000 \times g$ , por 15 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado sequencialmente com 10 mL de solução de acetato de amônio a 0,1 M (duas vezes), 10 mL de acetona a 80% (duas vezes) e com 10 mL de etanol a 90% (duas vezes). Cada etapa de lavagem do precipitado foi compreendida pela ressuspensão com agitação vigorosa em vortex e centrifugação a  $8.000 \times g$ , por 15 min. O precipitado final foi transferido para um microtubo de ensaio e deixado secar à temperatura ambiente, e após isso as proteínas extraídas foram finalmente solubilizadas em solução de ácido fórmico a 0,1%.

### ***2.2.8.2 Preparação das amostras e digestão triptica***

Antes de se proceder à digestão triptica, a concentração proteica das amostras foi dosada em espectrofotômetro de microvolumes (NanoVue™ Plus, GE Healthcare, UK), através de leituras de absorbância em 280 nm. De cada amostra, foi transferido um volume correspondente a 50 µg de proteína para microtubos de ensaio, o qual em seguida foi secado em concentrador de amostras a vácuo (mod. 5301, Eppendorf, Germany), por cerca de 3 h. Decorrido esse tempo, as proteínas de cada microtubo de ensaio foram tratadas seguidamente com o surfactante *RapiGest SF* (Waters Corporation, USA), DTT e iodoacetamida, conforme instruções do fabricante do *RapiGest SF*, que em conjunto visaram aumentar a solubilidade das proteínas e prepará-las para a digestão pela tripsina.

As amostras proteicas foram então digeridas pela tripsina [(*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade*, Promega, USA), concentração de 25 ng/µL, preparada em solução de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a 50 mM], sendo, para isso, mantidas a 37 °C por cerca de 20 h. Após esse tempo, procedeu-se à hidrólise do *RapiGest SF* pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) a 5 %, seguido de incubação das amostras a 37 °C, por 90 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $12.000 \times g$ , por 30 min, a 6 °C; os sobrenadantes obtidos foram transferidos para frascos específicos para LC-MS (Waters Total Recovery Vials, Waters Corporation, USA), aos quais foram adicionados acetonitrila a 3%, contendo ácido fórmico a 0,1%, e uma solução-padrão oriunda da digestão triptica da enzima álcool desidrogenase (ADH; *MassPREP ADH Digestion Standard*, Waters Corporation, USA). A concentração final das proteínas e da ADH em cada amostra foram, respectivamente, 500 ng/µL e 50 fmol/µL.

### **2.2.8.3 Espectrometria de massa e identificação das proteínas**

Os peptídios resultantes da digestão tríptica foram analisados por espectrometria de massa sequencial, com ionização por *electrospray*, acoplada a cromatografia líquida (LC-ESI-MS/MS). O sistema de cromatografia líquida (*Nano High Performance*, UPLC) era acoplado a um espectrômetro de massas híbrido de alta resolução (Q-TOF), com dois analisadores de massa (Q) e um analisador de tempo de voo (TOF; *time-of-flight*) (Waters Corporation, USA). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Os dados de espectrometria de massa obtidos foram processados utilizando o servidor *ProteinLynx Global Server* (PLGS), versão 2.0 (Waters Corp., USA). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo interno de determinação de íons e por procura em um banco de dados de *Zea mays* no *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB). As vias metabólicas e as funções biológicas das proteínas identificadas foram pesquisadas no UniProtKB.

### **2.2.9 Análise estatística**

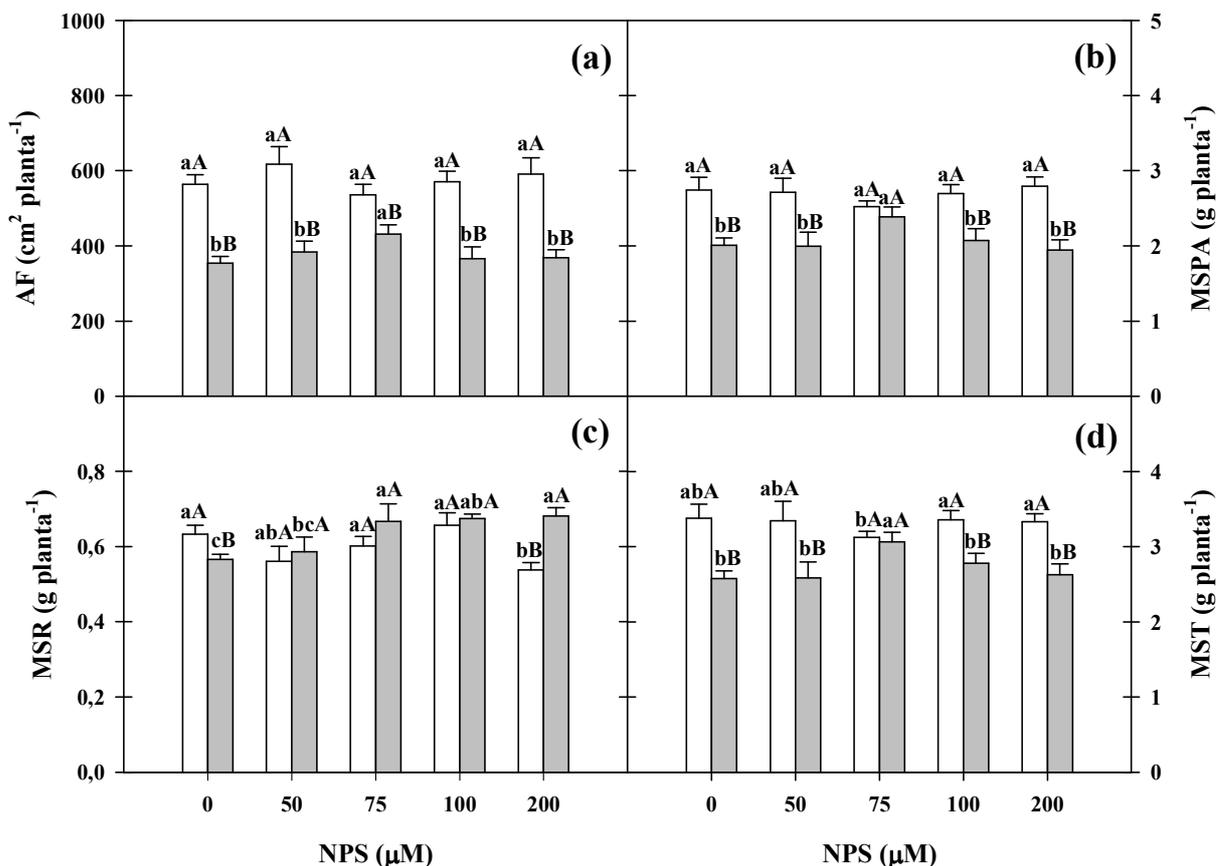
O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial: [2 (níveis de estresse salino) x 2 (concentrações de NPS)]. Cada tratamento foi formado por cinco repetições, que, por sua vez, foram constituídas por uma planta. Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste *F* de Snedecor;  $P \leq 0,05$ ) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Experimento I – Escolha da concentração de NPS adequada para o pré-tratamento das plantas de milho

Neste experimento, avaliaram-se alguns parâmetros fisiológicos e bioquímicos de plantas de milho submetidas à salinidade e previamente tratadas com NPS a diferentes concentrações, a fim de definir qual delas seria a mais adequada na indução da aclimatação a esse estresse.

O crescimento das plantas de milho foi significativamente afetado pelo estresse salino, e esse efeito dependeu da concentração de NPS utilizada no pré-tratamento das plantas (Figura 1).



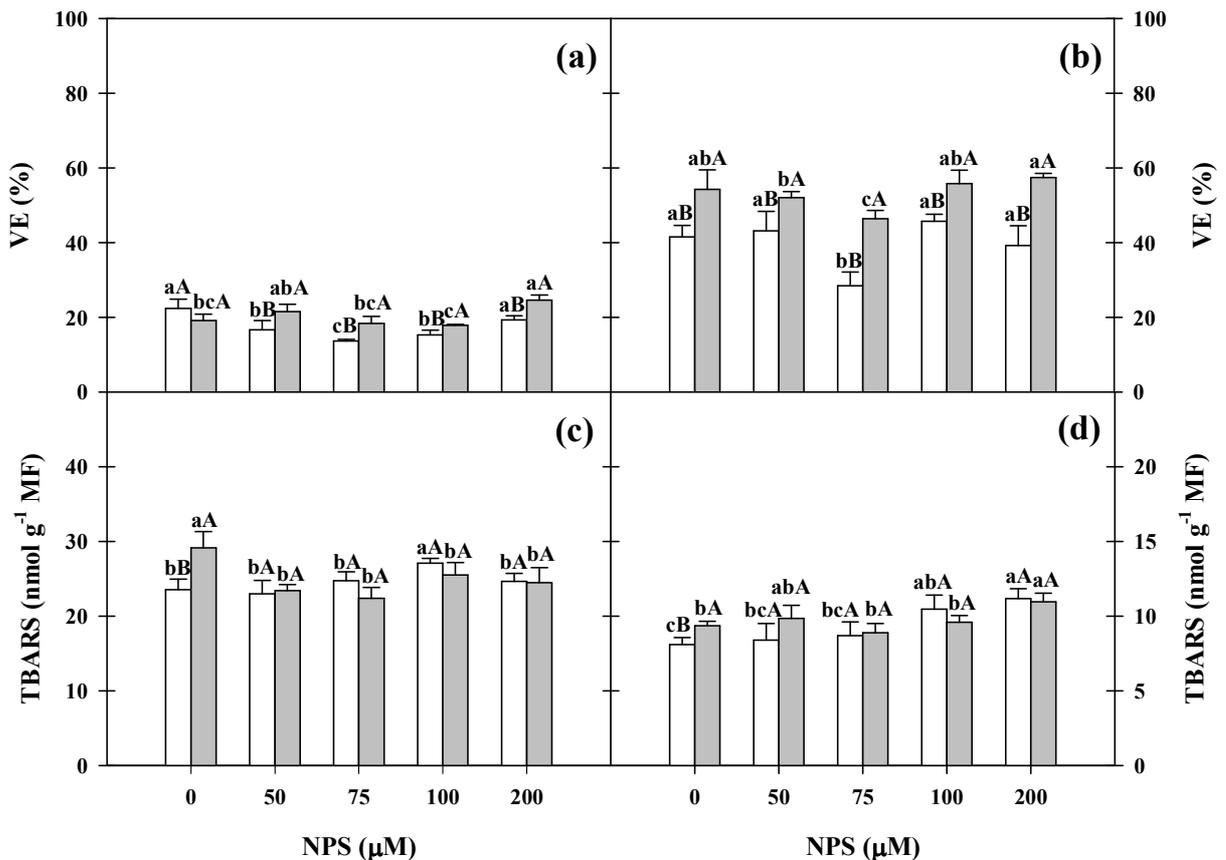
**Figura 1.** Área foliar (AF, a) e massa seca da parte aérea (MSPA, b), das raízes (MSR, c) e total (MST, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) e cultivadas na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em uma mesma concentração de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

A AF das plantas foi reduzida pela salinidade em todas as concentrações de NPS testadas, porém esse efeito foi menos evidente nas plantas pré-tratadas com NPS a 75  $\mu\text{M}$ , as quais apresentaram os maiores valores de AF entre as plantas sob estresse salino (Figura 1a). Quanto à MSPA, houve uma resposta semelhante àquela ocorrida com a AF, exceto que neste caso o pré-tratamento com NPS a 75  $\mu\text{M}$  conseguiu reverter a redução do crescimento da parte aérea, causada pela salinidade, mantendo-o semelhante àquela das plantas controle (Figura 1b). Em relação à MSR, apenas na ausência de pré-tratamento (NPS a 0  $\mu\text{M}$ ) é que a salinidade reduziu o crescimento radicular; nas concentrações de NPS a 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ , a MSR não foi afetada pelos sais, e, a 200  $\mu\text{M}$ , a MSR das plantas sob estresse foi maior que a das plantas controle (Figura 1c). Concordantemente, nas condições salinas, a MST das plantas pré-tratadas com NPS a 75  $\mu\text{M}$  foi maior que a dos demais pré-tratamentos, e o crescimento dessas plantas não diferiu daquele das plantas controle (Figura 1d).

Ao estudar o efeito do NPS no desenvolvimento de plântulas de repolho, Sung e Hong (2010) observaram que concentrações iguais a ou maiores que 50  $\mu\text{M}$  reduziram o alongamento da raiz nessa espécie, o qual foi fortemente afetado na maior concentração testada (500  $\mu\text{M}$ ; redução de 90%, aproximadamente). A aclimação de plantas de azevém (*Lolium perenne*), uma gramínea forrageira, ao estresse por cádmio, induzida pelo pré-tratamento com NPS, também dependeu da concentração desse composto no meio de cultivo; o crescimento das plantas foi aumentado em todas as concentrações testadas, quando comparado ao das plantas não pré-tratadas, e foi máximo na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (WANG *et al.*, 2013). Neste experimento, o pré-tratamento com NPS também afetou o crescimento das plantas de milho de maneira dependente da concentração, especialmente nas condições salinas, em que as plantas pré-tratadas com NPS a 75  $\mu\text{M}$  foram as que mais cresceram (Figura 1). Assim, fica evidente que as respostas induzidas pelo NPS variam de acordo com a espécie e com a concentração empregada, tornando-se premente a execução de experimentos preliminares, que definam a concentração adequada para o pré-tratamento das plantas.

O pré-tratamento com NPS a 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  reduziu o VE nas folhas das plantas de milho cultivadas nas condições controle, e isso foi mais evidente nas plantas pré-tratadas com NPS a 75  $\mu\text{M}$ ; nas condições de salinidade, o pré-tratamento com NPS causou poucas variações no VE das folhas, cujos valores em geral permaneceram maiores que aqueles encontrados nas condições controle (Figura 2a). Nas raízes, o VE foi significativamente aumentado nas condições de salinidade, e o pré-tratamento com NPS a 75  $\mu\text{M}$ , embora não tenha revertido os efeitos da salinidade, foi o único capaz de reduzir os valores dessa variável

nesses órgãos, resposta que também foi observada nas condições controle (Figura 2b). Os teores foliares e radiculares de TBARS, por sua vez, foram aumentados pela salinidade na ausência de pré-tratamento (NPS a 0  $\mu\text{M}$ ), porém, nas demais concentrações de NPS, a salinidade não afetou significativamente esses teores, independentemente do órgão analisado (Figuras 2c e 2d). Ademais, nas plantas controle, houve um aumento gradual nos teores radiculares de TBARS, em função da concentração de NPS (Figura 2d).



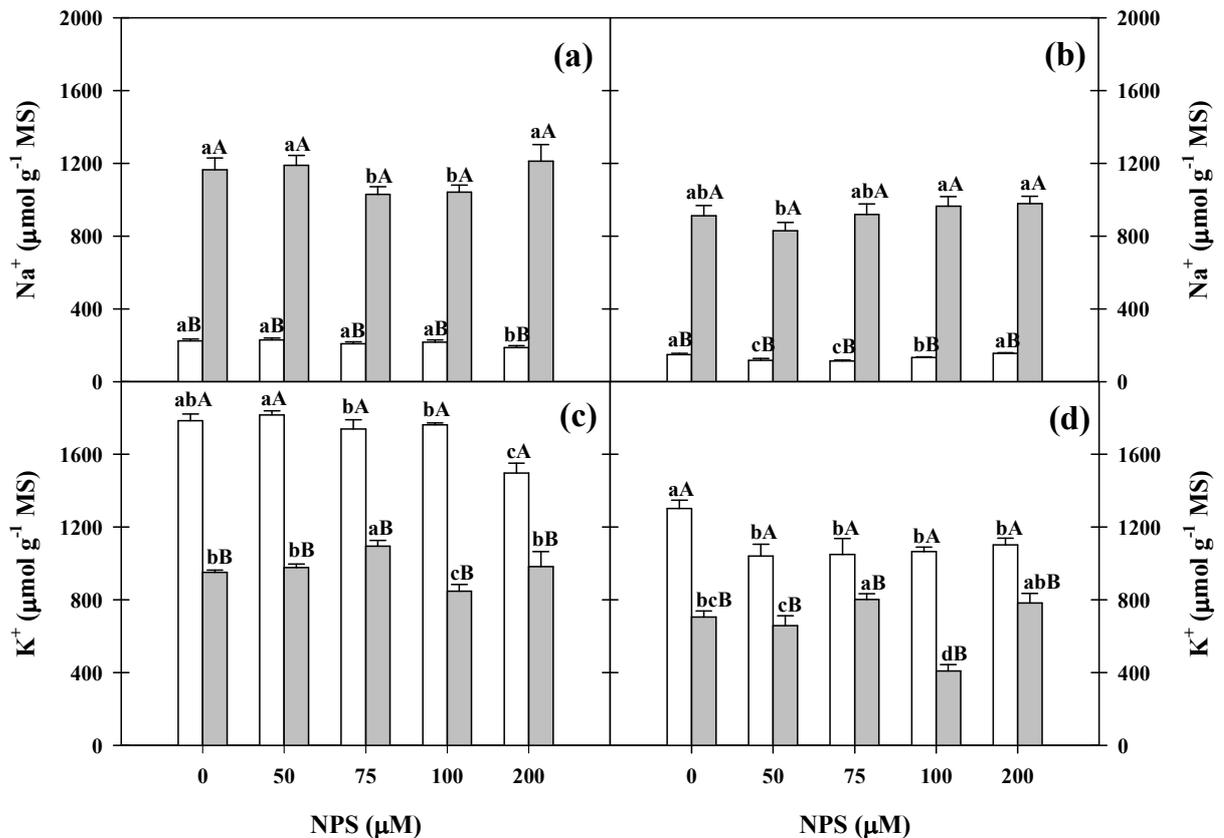
**Figura 2.** Vazamento de eletrólitos (VE) e teores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de folhas (a, c) e raízes (b, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) e cultivadas na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em uma mesma concentração de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

O vazamento de eletrólitos e da peroxidação de lipídios (através da determinação dos teores de TBARS) são dois parâmetros rotineiramente utilizados para avaliar a intensidade do estresse oxidativo em plantas. Neste experimento, os valores do VE e dos teores de TBARS variaram pouco entre as diferentes concentrações de NPS, mas se pôde inferir que, de modo geral, o pré-tratamento das plantas com NPS a 75  $\mu\text{M}$  foi o que resultou

no menor VE, tanto nas condições controle, quanto nas condições salinas, e que as plantas pré-tratadas que estiveram sob estresse foram capazes de manter os teores de TBARS em níveis similares aos do controle (Figura 2). Os efeitos protetores do NO contra danos oxidativos podem ocorrer por várias razões, que incluem desde a redução nos teores de ROS (por exemplo, a reação do NO com  $\cdot\text{O}_2^-$  diminui os teores desse radical na célula) até a indução da expressão de genes relacionados à defesa oxidativa (os genes que codificam as enzimas antioxidantes, por exemplo). Li *et al.* (2008) observaram um aumento significativo no VE e na peroxidação de lipídios nas folhas de plantas de cevada submetidas à salinidade (NaCl a 50 mM), mas quando se aplicou NPS a 50  $\mu\text{M}$  no meio de cultivo, tais aumentos foram menores, e isso foi acompanhado por uma maior atividade das enzimas SOD, APX e CAT.

Os teores de  $\text{Na}^+$  na parte aérea e nas raízes de milho foram significativamente aumentados em razão do estresse salino (Figura 3). Apesar disso, houve menor acúmulo desse íon na parte aérea das plantas pré-tratadas com NPS a 75 e 100  $\mu\text{M}$  (Figura 3a). Nas raízes, o pré-tratamento com NPS reduziu o acúmulo de  $\text{Na}^+$  apenas nas condições controle (Figura 3b). Coerentemente, os teores de  $\text{K}^+$  na parte aérea e nas raízes de milho foram reduzidos pela salinidade em todos os pré-tratamentos empregados. Em adição, nas condições de estresse salino, o pré-tratamento das plantas com NPS a 75  $\mu\text{M}$  resultou nos maiores teores de  $\text{K}^+$ , em ambos os órgãos analisados (Figura 3c e 3d).

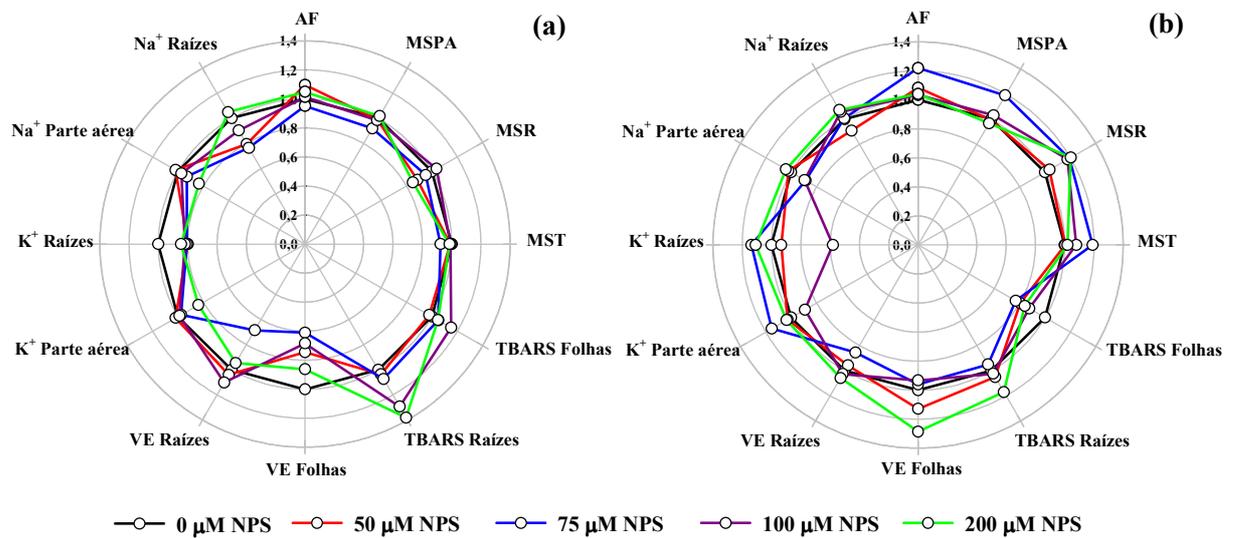
Os teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram determinados neste experimento com o propósito de se avaliar a influência do pré-tratamento com NPS a diferentes concentrações na homeostase iônica, em condições de salinidade. Mais uma vez, o pré-tratamento com NPS a 75  $\mu\text{M}$  foi o que proporcionou os melhores resultados, acarretando os menores teores de  $\text{Na}^+$ , na parte aérea, e os maiores teores de  $\text{K}^+$ , na parte aérea e na raiz (Figura 3). Essas alterações resultaram, por consequência, em uma maior razão  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , aumentando a tolerância das plantas nas condições salinas. Vários estudos têm demonstrado que os efeitos do componente iônico da salinidade devem-se não apenas a um aumento nos teores de  $\text{Na}^+$ , mas também à redução nos teores de  $\text{K}^+$ , decorrente possivelmente do fato de o  $\text{Na}^+$  competir com o  $\text{K}^+$  pelos mesmos sítios de transporte (TUTEJA *et al.*, 2012). Em folhas de plantas de mostarda submetidas à salinidade (NaCl a 150 mM), o tratamento com NPS a 200  $\mu\text{M}$  também proporcionou menor acúmulo de  $\text{Na}^+$  e maiores teores de  $\text{K}^+$ ; ao se tratar essas folhas com um composto removedor de NO, tais benefícios às plantas foram revertidos, mostrando que de fato o NO liberado pelo NPS esteve envolvido na indução dessas respostas (KHAN *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Teores de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> na parte aérea (a, c) e nas raízes (b, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) e cultivadas na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em uma mesma concentração de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

Pela análise conjunta dos dados, verificou-se que, nas plantas cultivadas na ausência de NaCl, o pré-tratamento com NPS induziu poucas variações no crescimento das plantas e nos teores de íons, ao passo que as alterações relacionadas ao estresse oxidativo (VE e teores de TBARS) se destacaram (Figura 4a). Nas condições salinas, o efeito do pré-tratamento sobre as plantas foi mais conclusivo, com destaque para a concentração de NPS a 75 μM, tendo havido, nesse caso, melhora do crescimento, redução ou inalterabilidade dos danos relacionados ao estresse oxidativo, manutenção de teores elevados de K<sup>+</sup> e redução do acúmulo de Na<sup>+</sup> na parte aérea das plantas (Figura 4b). Isso, portanto, levou à escolha da concentração de 75 μM como a adequada para testar os efeitos do pré-tratamento das plantas com NPS, sob estresse salino. Essa etapa inicial foi necessária, tendo em vista que o NPS ora pode ser indutor de aclimatação, ora causar efeitos tóxicos às plantas; a preponderância de um desses efeitos, em detrimento do outro, é dependente da concentração de NPS empregada,

bem como da proporção com que esse composto é degradado (FLORYSZAK-WIECZOREK *et al.*, 2006). Vale salientar ainda que o próprio NO pode causar estresse, caso presente em altas concentrações, pois ele causa a formação de espécies reativas de nitrogênio, as quais são responsáveis pelo denominado estresse nitrosativo (CORPAS *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Análise conjunta das alterações induzidas pelo pré-tratamento com nitroprussiato de sódio (NPS) em plantas de milho (*Zea mays*) cultivadas na ausência (a) ou na presença (b) de NaCl a 80 mM. Em cada variável, foram tomados como referência os valores apresentados pelas plantas não pré-tratadas (NPS a 0  $\mu\text{M}$ ).

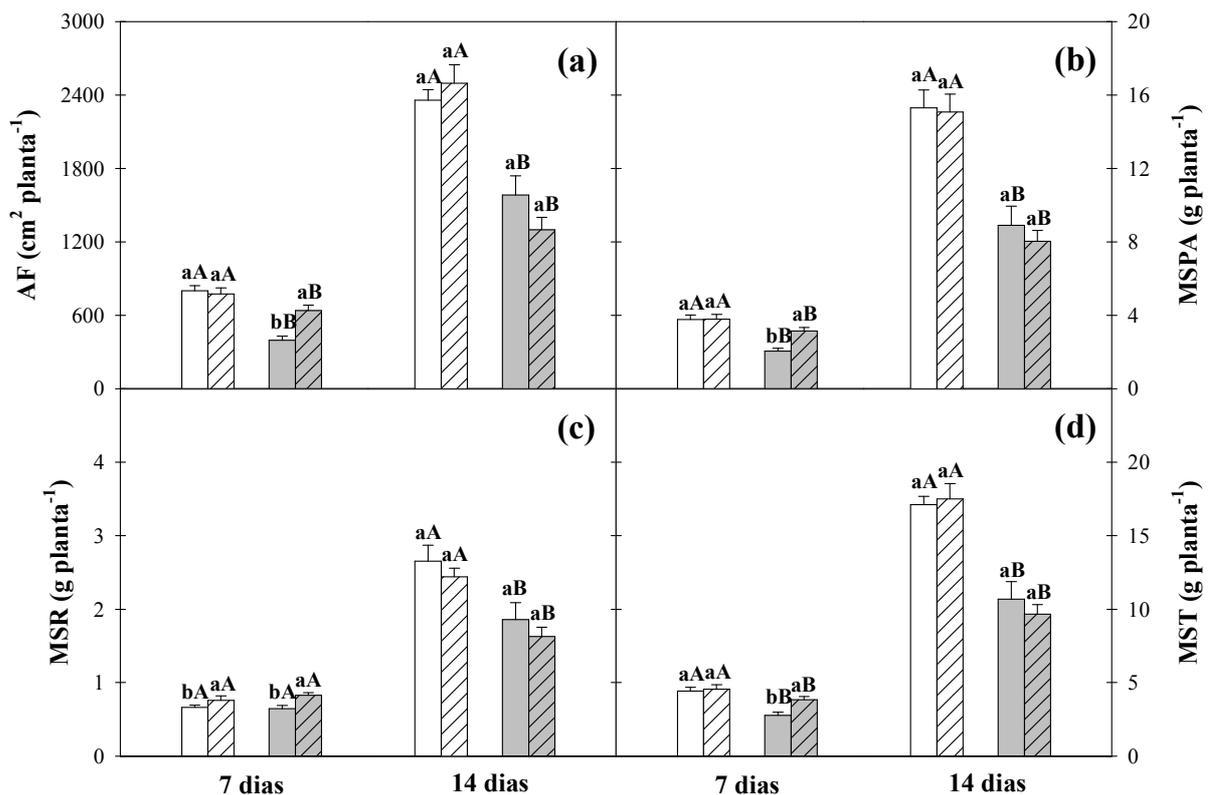
### 3.2 Experimento II – Aclimação à salinidade mediada pelo pré-tratamento com NPS a 75 $\mu\text{M}$

Este experimento teve como objetivo avaliar a aclimação de plantas de milho à salinidade, mediada pelo pré-tratamento com NPS a 75  $\mu\text{M}$ , bem como o padrão dessas respostas após 7 e 14 dias de estresse.

#### 3.2.1 Análise do crescimento e trocas gasosas

A AF das plantas de milho foi reduzida pela salinidade em ambos os tempos de coleta, no entanto, aos 7 dias de estresse, o pré-tratamento com NPS diminuiu tal efeito deletério nas plantas, pois, nas condições salinas, a AF das plantas pré-tratadas foi 61% maior que aquela das plantas não pré-tratadas (Figura 5a). Nas condições controle, o pré-tratamento com NPS não influenciou significativamente a AF das plantas de milho (Figura 5a).

O estresse salino reduziu o crescimento das plantas de milho, e esse efeito foi observado principalmente na parte aérea (Figura 5). Aos 7 dias de estresse, a redução média da MSPA, em função da salinidade, foi de 31%, enquanto que, aos 14 dias, essa redução foi de 44% (Figura 5b). Assim como na AF, o pré-tratamento com NPS resultou em um aumento significativo na MSPA das plantas sob estresse (53%), em comparação àquelas não pré-tratadas, que foi observado apenas aos 7 dias de estresse (Figura 5b). Já a MSR não foi afetada pela salinidade aos 7 dias de estresse, mas, aos 14 dias, essa variável foi reduzida em 32%, em média (Figura 5c). Aos 7 dias, o pré-tratamento com NPS induziu um aumento significativo da MSR em ambas as condições de salinidade, mas não surtiu efeito algum na MSR das plantas, aos 14 dias de estresse (Figura 5c). A MST das plantas de milho seguiu a mesma tendência apresentada pela MSPA: houve reduções significativas em ambos os tempos de coleta, mas somente aos 7 dias de estresse é que o pré-tratamento com NPS resultou em uma maior MST das plantas (Figura 5d).

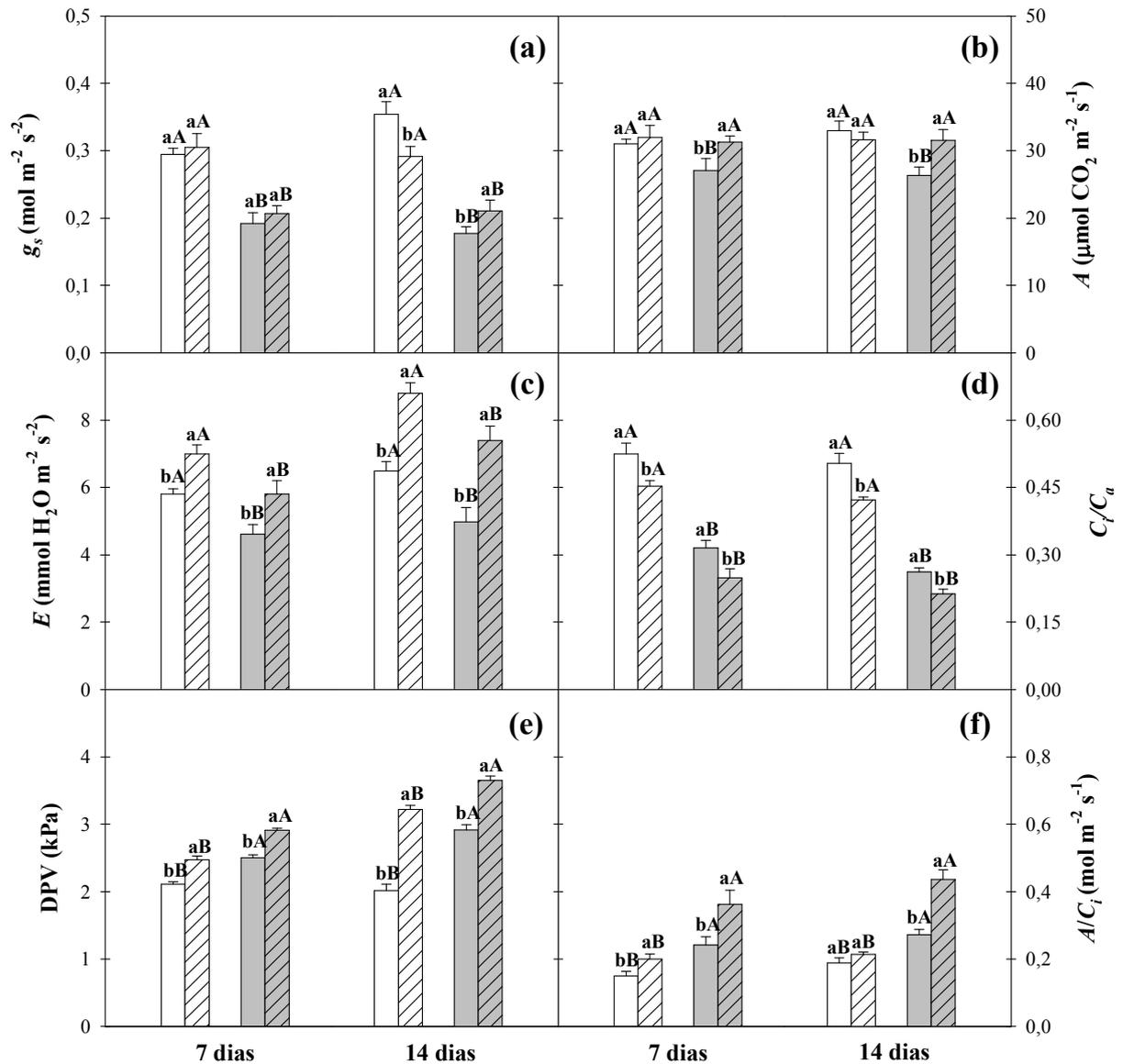


**Figura 5.** Área foliar (AF, a) e massa seca da parte aérea (MSPA, b), das raízes (MSR, c) e total (MST, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu$ M (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

Sabe-se que o crescimento do milho é severamente afetado pelo estresse salino, e isso está bem documentado na literatura científica (AZEVEDO NETO; TABOSA, 2000; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005; AZEVEDO NETO *et al.*, 2006; GONDIM *et al.*, 2012). Uma das razões pelas quais as plantas crescem menos em condições de salinidade é o fato de a expansão celular ser reduzida por esse estresse (PARIDA; DAS, 2005), devido a alterações na pressão de turgescência ou nas propriedades da parede celular. Geilfus, Zörb e Mühling (2010), estudando duas variedades de milho com tolerância diferencial à salinidade, observaram uma forte correlação entre a resposta do crescimento e a abundância da proteína  $\beta$ -expansina — uma das enzimas responsáveis pelo relaxamento e extensão da parede celular — bem como de seus transcritos; as plantas da variedade sensível cresceram menos sob estresse salino (NaCl a 100 mM, por 8 dias), e houve uma menor expressão da  $\beta$ -expansina, ao passo que o crescimento das plantas da variedade tolerante não foi afetado pela salinidade, e isso foi acompanhado por um aumento nos níveis de seus transcritos, denotando o envolvimento da  $\beta$ -expansina na tolerância dessa variedade à salinidade (GEILFUS; ZÖRB; MÜHLING, 2010).

Em diversas espécies, a tolerância à salinidade é aumentada ao se aplicar NPS no meio de cultivo ou através da pulverização foliar, por exemplo, no algodoeiro (DONG *et al.*, 2014), na soja (EGBICHI; KEYSTER; LUDIDI, 2014) e no tomateiro (WU *et al.*, 2010), e em todos esses casos, houve indução do crescimento das plantas, nas condições salinas. Um estudo anterior já havia demonstrado esse mesmo efeito benéfico no milho: a MSPA e a MSR de plantas pré-tratadas com NPS a 100  $\mu$ M e submetidas à salinidade (NaCl a 100 mM) foi 27,8% e 57,7% maior, respectivamente, que aquela de plantas não pré-tratadas, nas mesmas condições, porém, nesse caso, tais efeitos foram avaliados apenas aos 8 dias de estresse salino (ZHANG *et al.*, 2006). Por outro lado, no presente experimento, avaliou-se o crescimento do milho aos 7 e 14 dias de estresse, e isso permitiu constatar que aparentemente os efeitos benéficos do NPS às plantas de milho não perduram, ao menos nas condições experimentais empregadas. É provável que os genes induzidos pelo NO (liberado do NPS) que contribuíram para o aumento da tolerância à salinidade tenham sido expressos transientemente, uma vez que, aos 14 dias de estresse, essa resposta já não foi mais observada.

Como observado na Figura 6a, o estresse salino reduziu a  $g_s$  das plantas de milho, em ambos os tempos de coleta, e o pré-tratamento com NPS resultou em diferenças significativas nessa variável aos 14 dias de estresse. Nesse tempo de coleta, as plantas controle que foram pré-tratadas com NPS tiveram menor  $g_s$  que as não pré-tratadas, ao passo que, sob estresse, a  $g_s$  foi significativamente maior nas plantas pré-tratadas (Figura 6a).



**Figura 6.** Condutância estomática ( $g_s$ , a), fotossíntese líquida ( $A$ , b), transpiração ( $E$ , c), relação entre as concentrações interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ), déficit de pressão de vapor (DPV) entre a folha e o ar adjacente (e) e eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu\text{M}$  (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

Apesar das intensas reduções observadas na  $g_s$ , a  $A$  das plantas de milho foi pouco afetada pela salinidade (Figura 6b). Nas condições controle, não houve alterações significativas na  $A$  em razão do pré-tratamento das plantas, mas, nas condições salinas, o pré-tratamento com NPS resultou em um aumento significativo da  $A$ , em ambos os tempos de coleta, tendo revertido, portanto, o efeito deletério da salinidade sobre essa variável (Figura

6b). De modo geral, a  $E$  foi reduzida pela salinidade e aumentada quando se empregou o pré-tratamento com NPS (Figura 6c). A  $C_i/C_a$ , por sua vez, foi reduzida em condições de salinidade, e esse efeito foi exacerbado quando as plantas sofreram pré-tratamento com NPS a 75  $\mu\text{M}$  (Figura 6d). Em ambos os tempos de coleta, o DPV entre a folha e o ar adjacente foi aumentado pela salinidade, e, além disso, o pré-tratamento das plantas induziu maior DPV, tanto nas condições controle, quanto nas condições de estresse salino (Figura 6e). Por fim, a eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) das plantas sob estresse salino foi significativamente maior que a das plantas controle, nos dois tempos de coleta, e, de modo geral, o pré-tratamento com NPS tornou essas plantas ainda mais eficientes na fixação do  $\text{CO}_2$  (aumento médio de 55%) (Figura 6f).

Uma das respostas imediatas ao estresse salino é o fechamento estomático, que impacta negativamente a difusão de  $\text{CO}_2$  através dos estômatos e do mesófilo e, por conseguinte, a fotossíntese (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; ASHRAF; HARRIS, 2013). A regulação da  $g_s$  (e da condutância mesofílica), em função do grau de abertura dos estômatos, é mediada principalmente pelo ácido abscísico (ABA), mas requer também outras moléculas, tais como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o NO (NEILL *et al.*, 2008; WANG; SONG, 2008; SONG *et al.*, 2014). Contudo, os efeitos do estresse salino na fotossíntese não se devem apenas a questões estomáticas, mas também a limitações não estomáticas, em consequência, por exemplo, de danos aos pigmentos fotossintéticos e aos fotossistemas, bem como às enzimas envolvidas no processo de fixação do  $\text{CO}_2$  (OMOTO; TANIGUCHI; MIYAKE, 2012; ASHRAF; HARRIS, 2013).

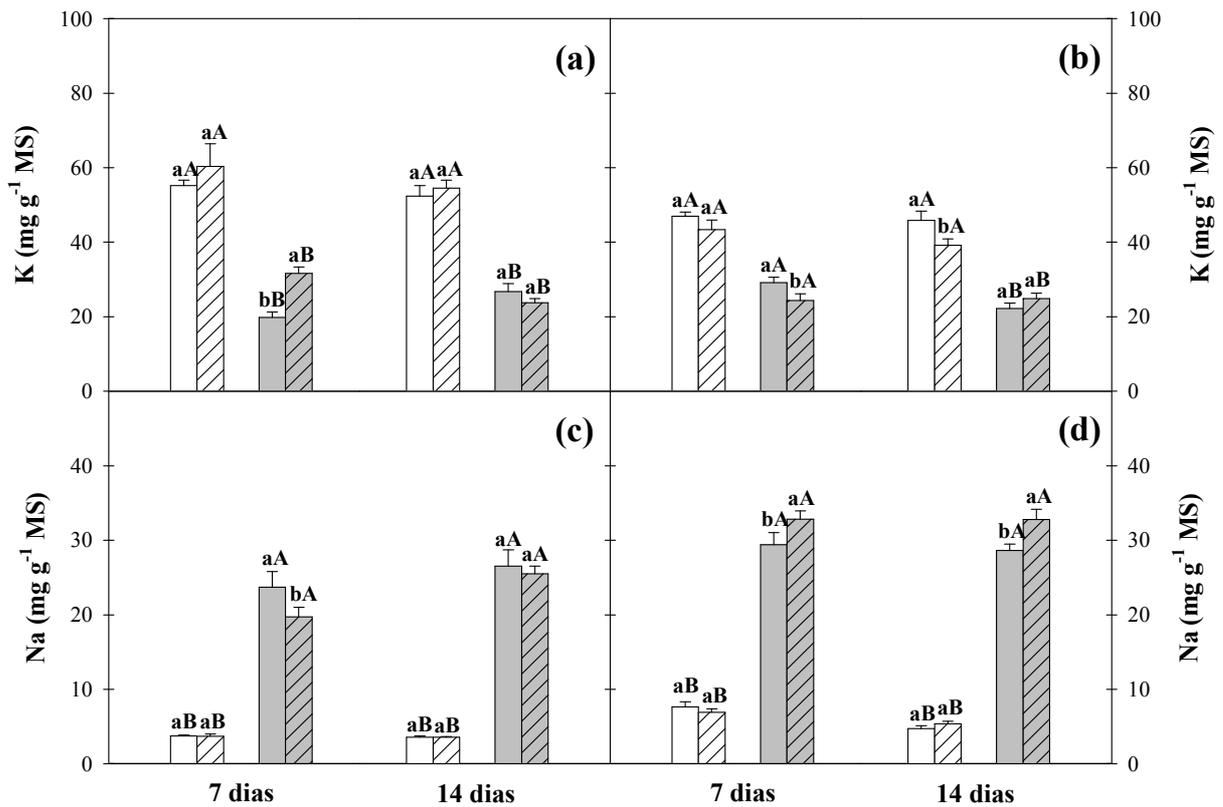
A redução na  $g_s$  das plantas de milho sob estresse salino correlacionou-se fortemente com a redução da  $E$  e da  $C_i/C_a$ , e ainda com a redução da  $A$ , porém em menor proporção; apesar de a salinidade ter reduzido a relação  $C_i/C_a$  nas plantas de milho, a concentração interna de  $\text{CO}_2$  nas folhas ainda foi suficiente para manter a  $A$  em níveis elevados (Figura 6). Sabe-se há algum tempo que o NO, tanto de origem endógena, quanto exógena, induz o fechamento estomático, e esse efeito é inibido quando compostos removedores de NO ou inibidores da síntese dessa molécula estão presentes no meio (GARCIA-MATA; LAMATTINA, 2001; NEILL *et al.*, 2008). No entanto, há ao menos um relato indicando resposta contrária a essa; em *Vicia faba*, a abertura estomática foi induzida pelo emprego de SNAP a 5 mM (SAKIHAMA; MURAKAMI; YAMASAKI, 2003). Neste experimento, contudo, as variações na  $g_s$  das plantas de milho, em função do pré-tratamento com NPS, foram pouco conclusivas. Além disso, o DPV entre a folha e o ar adjacente nas plantas pré-tratadas não influenciou a  $g_s$ ; quanto maior o DPV entre a folha e o ar adjacente,

maior a tendência de a planta perder água através da transpiração, e geralmente essa condição induz fechamento estomático (LARCHER, 2000), que não ocorreu nas plantas de milho pré-tratadas com NPS, as quais ainda apresentaram valores elevados de  $E$ .

Ao se avaliar o efeito benéfico do pré-tratamento com NPS sobre a  $A$ , pode-se inferir que ele não se relacionou a fatores estomáticos, nem à difusão do  $\text{CO}_2$ , pois além de a  $g_s$  não ter variado significativamente, as plantas pré-tratadas e sob estresse salino foram as que apresentaram os menores valores de  $C_i/C_a$ . Portanto, tal efeito do NPS nas plantas de milho envolveu outros aspectos do processo fotossintético. Em plantas de tomate, a aplicação de NPS a 100  $\mu\text{M}$  também resultou no aumento da  $A$  em condições de salinidade, que foi acompanhado por um aumento no *quenching* fotoquímico; assim, houve maior proporção de centros de reação do fotossistema II abertos, a despeito da condição estressante em que as plantas se encontravam (WU *et al.*, 2010). Um estudo com plantas de arroz (uma gramínea  $C_3$ ) transgênicas, superexpressando a carboxilase do fosfoenolpiruvato (oriunda do milho, uma gramínea  $C_4$ ), mostrou que a aplicação de diferentes compostos liberadores de NO, entre eles, o NPS, induziu aumento na atividade e na expressão dessa enzima, que foi revertido na presença de compostos removedores de NO (PINGBO *et al.*, 2014). Pode ter havido uma resposta similar a essa neste experimento, dada a alta eficiência de carboxilação das plantas sob estresse e pré-tratadas com NPS a 75  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.2 Análises minerais

Os teores de K e Na na parte aérea e nas raízes das plantas de milho estão apresentados na Figura 7. De modo geral, as plantas sob estresse acumularam menos K que aquelas nas condições controle, independentemente do tempo de coleta e da parte da planta analisada (Figura 7a e 7b). Aos 7 dias, o pré-tratamento com NPS resultou em um maior acúmulo de K na parte aérea das plantas sob estresse salino, que foi acompanhado por uma redução nos teores radiculares desse elemento, em comparação com as plantas não pré-tratadas e sob as mesmas condições de salinidade (Figura 7a e 7b). Como esperado, houve um maior acúmulo de Na nas plantas que estiveram sob estresse salino, nos dois tempos de coleta e em ambas as partes da planta analisadas (Figura 7c e 7d). Aos 7 dias, as plantas sob estresse e que foram pré-tratadas com NPS acumularam menos Na na parte aérea, enquanto que, aos 14 dias, os teores de Na nas plantas sob estresse não diferiram significativamente daqueles das plantas controle (Figura 7c). Nas raízes, por sua vez, as plantas pré-tratadas e sob estresse acumularam mais Na que aquelas não pré-tratadas (Figura 7d).



**Figura 7.** Teores de K e Na na parte aérea (a, c) e nas raízes (b, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu\text{M}$  (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

Em ambos os tempos de coleta, a eficiência de absorção de K ( $EA_K$ ) foi reduzida significativamente nas plantas sob estresse salino, em comparação àquela das plantas controle, porém, aos 7 dias, o pré-tratamento com NPS a 75  $\mu\text{M}$  foi capaz de diminuir tal efeito, uma vez que, nas condições salinas, a  $EA_K$  de plantas pré-tratadas foi 40% maior que a de plantas não pré-tratadas (Tabela 1). Além disso, de maneira concordante, a eficiência de transporte de K ( $ET_K$ ) foi também maior nas plantas pré-tratadas com NPS e sob 7 dias de estresse (aumento médio de 23%); a  $ET_K$  das plantas aos 14 dias não variou significativamente em função do estresse salino, nem em função do pré-tratamento com NPS (Tabela 1). Em quaisquer tempos de coleta, as plantas sob estresse salino apresentaram maior eficiência de absorção de Na ( $EA_{Na}$ ) que as plantas controle, sem haver efeito significativo do pré-tratamento com NPS (Tabela 1). Aos 7 dias, a  $ET_{Na}$  foi aumentada pela salinidade na ausência de pré-tratamento, mas isso foi revertido quando se pré-trataram as plantas com NPS, mantendo o valor de  $ET_{Na}$ , nesse caso, comparável ao do controle (Tabela 1).

**Tabela 1.** Eficiências de absorção (EA) e de transporte (ET) de K ( $EA_K$ ;  $ET_K$ ) e Na ( $EA_{Na}$ ;  $ET_{Na}$ ) em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

NaCl	NPS	$EA_K$		$EA_{Na}$	
		(mg nutriente $\text{g}^{-1}$ massa seca de raiz)			
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
0 mM	0 $\mu\text{M}$	362,12 aA	330,66 aA	28,24 aB	23,66 aB
	75 $\mu\text{M}$	340,28 aA	373,41 aA	24,95 aB	27,34 aB
80 mM	0 $\mu\text{M}$	92,99 bB	158,31 aB	101,04 aA	158,47 aA
	75 $\mu\text{M}$	130,21 aB	142,50 aB	99,19 aA	160,47 aA

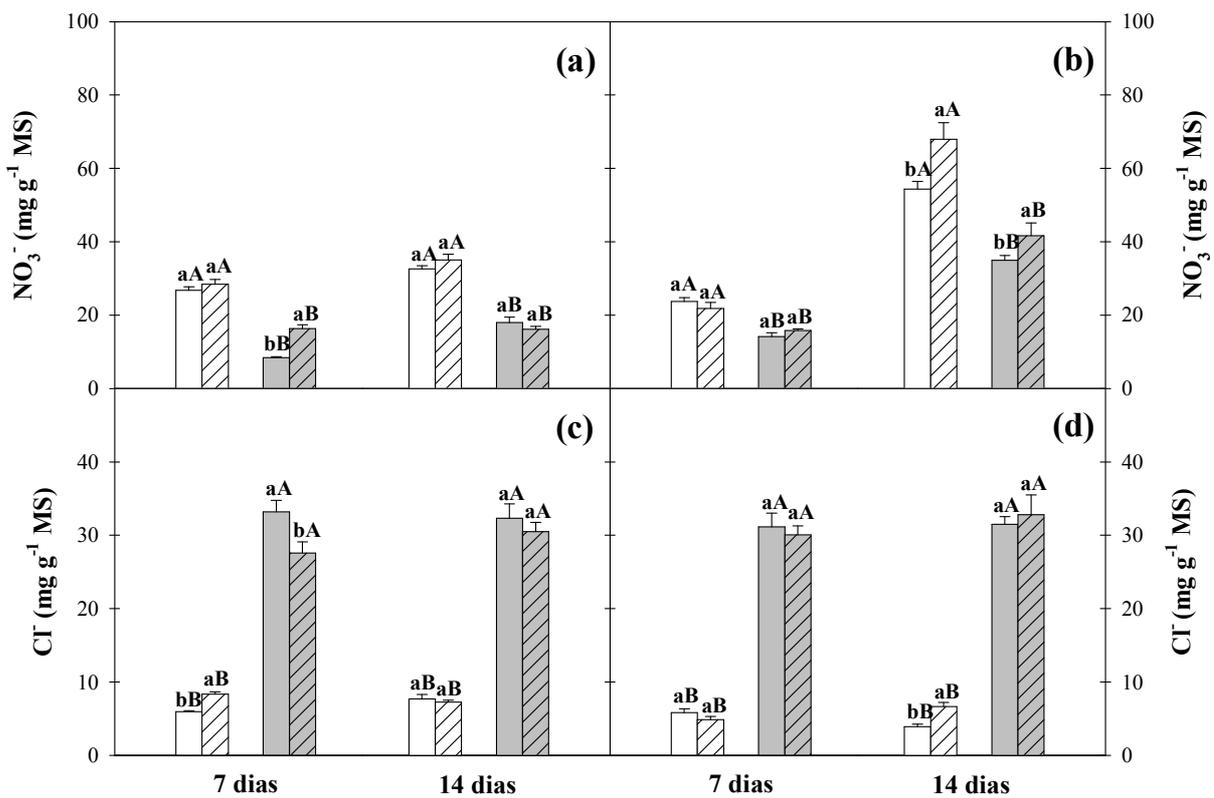
  

NaCl	NPS	$ET_K$		$ET_{Na}$	
		(mg nutriente parte aérea $\text{mg}^{-1}$ nutriente planta)			
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
0 mM	0 $\mu\text{M}$	1,02 aA	1,02 aA	0,85 aB	0,94 aA
	75 $\mu\text{M}$	1,05 aA	1,04 aA	0,86 aA	0,93 aA
80 mM	0 $\mu\text{M}$	0,86 bB	1,03 aA	0,95 aA	0,99 aA
	75 $\mu\text{M}$	1,06 aA	0,99 aA	0,88 bA	0,95 aA

Na maioria das espécies submetidas à salinidade, o íon mais tóxico é o  $\text{Na}^+$ , e frequentemente nessa condição as plantas apresentam redução de seus teores de  $\text{K}^+$  e da razão  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , tanto em função da competição entre esses dois íons pelos mesmos sítios de absorção, quanto do efluxo aumentado de  $\text{K}^+$  causado pelo  $\text{Na}^+$  em excesso (WAKEEL, 2013; MAATHUIS, 2013). A manutenção de uma razão  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  elevada é vital para o funcionamento das células, especialmente na parte aérea, onde predomina os tecidos fotossintetizantes, dessa maneira, o controle do transporte de íons tóxicos para a parte aérea e o acúmulo deles nas raízes compreendem um importante mecanismo de tolerância das plantas à salinidade (PARIDA; DAS, 2005; HASEGAWA, 2013). O maior acúmulo de K na parte aérea das plantas de milho pré-tratadas com NPS e sob estresse, aos 7 dias, foi decorrente da absorção aumentada de K e do maior transporte desse nutriente para a parte aérea das plantas, mas essas respostas não se estenderam até 14 dias de estresse (Figura 7 e Tabela 1). Apesar de a  $EA_{Na}$  nas condições salinas ter sido equivalente em ambos os pré-tratamentos, aos 7 dias, as plantas pré-tratadas com NPS acumularam Na preferencialmente na raiz, evitando o acúmulo

desse íon tóxico na parte aérea (Figura 7 e Tabela 1). Alguns autores mostraram que a aplicação de NO melhora a homeostase  $K^+/Na^+$  em plantas submetidas à salinidade (ZHANG *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2009). Em um desses estudos, o pré-tratamento de milho com NPS a 100  $\mu$ M aumentou a atividade da  $H^+$ -ATPase e da  $H^+$ -PPiase do tonoplasto, em condições salinas, e isso resultou em uma maior atividade do transportador antiporte  $Na^+/H^+$  do tonoplasto, contribuindo para a homeostase iônica dessas plantas (ZHANG *et al.*, 2006).

Os teores de  $NO_3^-$  na parte aérea das plantas foram drasticamente reduzidos nas condições salinas, em ambos os tempos analisados, porém, aos 7 dias, o pré-tratamento com NPS amenizou essa redução (Figura 8a). Nas raízes, os teores de  $NO_3^-$  aos 7 dias variaram apenas em função da salinidade, sendo reduzidos em tais condições, enquanto que, aos 14 dias, os teores desse íon, além de terem sido reduzidos pela salinidade, aumentaram em decorrência do pré-tratamento com NPS, tanto nas condições controle, quanto nas condições salinas (Figura 8b).



**Figura 8.** Teores de  $NO_3^-$  e  $Cl^-$  na parte aérea (a, c) e nas raízes (b, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu$ M (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

Como esperado, os teores de  $\text{Cl}^-$  foram substancialmente aumentados pela salinidade, em todos os tempos estudados e nas duas partes da planta (Figura 8c e 8d). Na parte aérea, houve menor acúmulo de  $\text{Cl}^-$  nas plantas pré-tratadas com NPS, que se manifestou apenas aos 7 dias, enquanto que, nas raízes, não houve qualquer efeito do pré-tratamento com NPS nas plantas sob condições salinas (Figura 8c e 8d).

A eficiência de absorção de  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{EA}_{\text{NO}_3}$ ) em ambos os tempos de coleta foi reduzida pela salinidade, mas, aos 7 dias, o pré-tratamento com NPS amenizou isso (Tabela 2). Houve um aumento na eficiência de absorção de  $\text{Cl}^-$  ( $\text{EA}_{\text{Cl}}$ ), em razão do estresse salino, em ambos os tempos de coleta, sem haver qualquer efeito significativo do pré-tratamento com NPS (Tabela 2). Concordantemente, a eficiência de transporte de  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{ET}_{\text{NO}_3}$ ) aumentou nas plantas pré-tratadas com NPS e sob estresse salino, aos 7 dias, quando comparadas às não pré-tratadas, ao passo que a eficiência de transporte de  $\text{Cl}^-$  ( $\text{EA}_{\text{Cl}}$ ) manteve-se praticamente inalterada, em ambos os tempos de coleta (Tabela 2).

**Tabela 2.** Eficiências de absorção (EA) e de transporte (ET) de  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{EA}_{\text{NO}_3}$ ;  $\text{ET}_{\text{NO}_3}$ ) e  $\text{Cl}^-$  ( $\text{EA}_{\text{Cl}}$ ;  $\text{ET}_{\text{Cl}}$ ) em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

NaCl	NPS	$\text{EA}_{\text{NO}_3}$		$\text{EA}_{\text{Cl}}$	
		<b>(mg nutriente parte aérea <math>\text{mg}^{-1}</math> nutriente total)</b>			
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
0 mM	0 $\mu\text{M}$	173,82 aA	235,36 bA	37,47 bB	39,58 bB
	75 $\mu\text{M}$	164,08 aA	283,09 aA	45,83 aB	51,37 aB
80 mM	0 $\mu\text{M}$	38,22 bB	124,72 aB	131,26 aA	179,16 aA
	75 $\mu\text{M}$	66,73 aB	121,80 aB	123,98 bA	187,12 aA

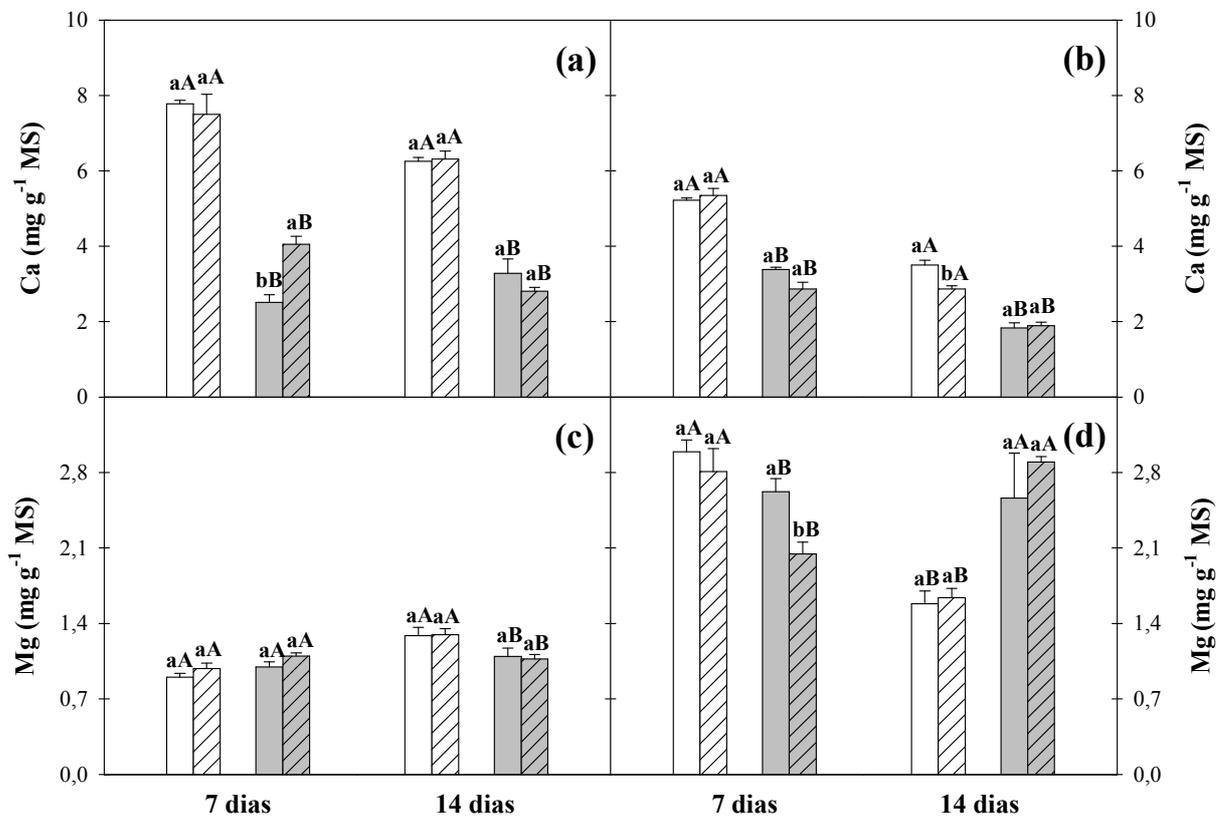
NaCl	NPS	$\text{ET}_{\text{NO}_3}$		$\text{ET}_{\text{Cl}}$	
		<b>(mg nutriente parte aérea <math>\text{mg}^{-1}</math> nutriente planta)</b>			
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
0 mM	0 $\mu\text{M}$	1,03 aA	0,89 aA	1,00 bA	1,04 aA
	75 $\mu\text{M}$	1,04 aA	0,89 aA	1,08 aA	1,00 aA
80 mM	0 $\mu\text{M}$	0,80 bB	0,85 aA	1,00 aA	1,02 aA
	75 $\mu\text{M}$	1,00 aA	0,79 bB	0,96 aB	0,99 aA

O  $\text{NO}_3^-$  é uma das formas inorgânicas sob as quais o nitrogênio é absorvido pelas plantas, e, de maneira geral, é a que prepondera nos solos agricultáveis, pois, além de estar presente em maiores concentrações que o  $\text{NH}_4^+$ , pode mover-se livremente, já que a maioria dos solos possui carga líquida negativa (MILLER; CRAMER, 2004). Somente parte do  $\text{NO}_3^-$  absorvido pelas raízes é assimilada nesse órgão; o restante é transportado através do xilema para a parte aérea, onde é assimilado nas folhas (MILLER; CRAMER, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009). Sob estresse salino, especialmente quando induzido por NaCl, os teores de  $\text{NO}_3^-$  das plantas tendem a ser reduzidos, devido à menor absorção desse íon, que compete diretamente com o  $\text{Cl}^-$  pelo mesmo transportador, a um menor carregamento de  $\text{NO}_3^-$  através do xilema radicular ou a alterações na integridade da membrana, causada pelos sais em excesso (MANSOUR; SALAMA, 2004; ARAGÃO *et al.*, 2010; BARHOUMI *et al.*, 2010; FEIJÃO *et al.*, 2013). Apesar de muitos estudos responsabilizarem o Na pelos efeitos deletérios da salinidade nas plantas, deve-se ter em mente que o  $\text{Cl}^-$ , ao se acumular em altas concentrações no citosol, torna-se igualmente tóxico às células vegetais, e em certas espécies, como as dos gêneros *Citrus* e *Vitis*, a toxicidade causada pelo  $\text{Cl}^-$  é mais significativa que a causada pelo  $\text{Na}^+$  (TEAKLE; TYERMAN, 2010).

Neste experimento, coerentemente, o acúmulo elevado de  $\text{Cl}^-$  nas plantas de milho afetou a absorção de  $\text{NO}_3^-$ , reduzindo, assim, os teores desse íon em ambas as partes da planta (Figura 8 e Tabela 2). O efeito benéfico do NPS sobre os teores de  $\text{NO}_3^-$ , aos 7 dias, deveu-se à maior absorção desse nutriente pela planta. Além disso, nesse mesmo tempo, as plantas pré-tratadas com NPS foram mais eficientes em transportar o  $\text{NO}_3^-$  para a parte aérea, onde ele se acumulou, e absorveram menos  $\text{Cl}^-$ . Aos 14 dias, os teores aumentados de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes, em razão do pré-tratamento com NPS, ocorreram por motivos distintos: nas condições controle, as plantas pré-tratadas absorveram mais  $\text{NO}_3^-$  que as não pré-tratadas, e como a  $\text{ET}_{\text{NO}_3}$  em ambos os casos foi semelhante, o  $\text{NO}_3^-$  absorvido a mais se acumulou nas raízes; já nas condições salinas, as plantas não pré-tratadas e pré-tratadas absorveram  $\text{NO}_3^-$  em uma mesma proporção, mas essas últimas foram menos eficientes em transportá-lo para a parte aérea (Figura 8 e Tabela 2). Ainda nesse tempo, os benefícios decorrentes do pré-tratamento com NPS, observados anteriormente, não perduraram, uma vez que, nas condições salinas, a absorção de  $\text{Cl}^-$  e o seu transporte para a parte aérea não dependeram do NPS.

De modo geral, os teores de Ca na parte aérea e nas raízes das plantas de milho foram fortemente reduzidos pelo estresse salino (Figura 9a e 9b). Aos 7 dias, no entanto, o pré-tratamento com NPS aumentou em 61% os teores de Ca da parte aérea das plantas sob estresse, em comparação àqueles das plantas não pré-tratadas; aos 14 dias, não houve

qualquer influência significativa desse pré-tratamento sobre os teores de Ca (Figura 9a). Nas raízes, o pré-tratamento com NPS surtiu efeito significativo apenas aos 14 dias, nas plantas sob condições controle, em que houve redução dos teores de Ca (Figura 9b). Os teores de Mg na parte aérea das plantas de milho, aos 7 dias, não foram alterados significativamente pelo estresse salino, nem pelo pré-tratamento com NPS, mas eles foram reduzidos aos 14 dias, em função da salinidade (Figura 9c). Por outro lado, nas raízes, as alterações decorrentes da salinidade dependeram do tempo durante o qual as plantas estiveram sob estresse; a salinidade reduziu os teores radiculares de Mg aos 7 dias, sendo esse efeito ainda maior nas plantas pré-tratadas com NPS, ao passo que, aos 14 dias, houve um maior acúmulo de Mg nas raízes das plantas sob estresse salino, independentemente do pré-tratamento das plantas (Figura 9d).



**Figura 9.** Teores de Ca e Mg na parte aérea (a, c) e nas raízes (b, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75 μM (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

A eficiência de absorção de Ca ( $EA_{Ca}$ ) e Mg ( $EA_{Mg}$ ) das plantas aos 7 dias foi reduzida pelo estresse salino; nesse mesmo tempo de coleta, a  $EA_{Ca}$  das plantas pré-tratadas

com NPS, nas condições salinas, aumentou 42%, em comparação com a  $EA_{Ca}$  das plantas não pré-tratadas (Tabela 3). Aos 14 dias, tanto a  $EA_{Ca}$ , quanto a  $EA_{Mg}$  foram reduzidas pela salinidade, sem, no entanto, ter havido qualquer efeito do pré-tratamento com NPS (Tabela 3).

**Tabela 3.** Eficiências de absorção (EA) e de transporte (ET) de Ca ( $EA_{Ca}$ ;  $ET_{Ca}$ ) e Mg ( $EA_{Mg}$ ;  $ET_{Mg}$ ) em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

NaCl	NPS	$EA_{Ca}$		$EA_{Mg}$	
		(mg nutriente $\text{g}^{-1}$ massa seca de raiz)			
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
0 mM	0 $\mu\text{M}$	49,41 aA	38,25 aA	8,62 aA	9,02 aA
	75 $\mu\text{M}$	42,32 aA	41,74 aA	7,74 aA	9,09 aA
80 mM	0 $\mu\text{M}$	11,49 bB	17,21 aB	6,15 aB	7,33 aB
	75 $\mu\text{M}$	16,42 aB	15,81 aB	5,62 bB	8,52 aB

NaCl	NPS	$ET_{Ca}$		$ET_{Mg}$	
		(mg nutriente parte aérea $\text{mg}^{-1}$ nutriente planta)			
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
0 mM	0 $\mu\text{M}$	1,04 aA	1,07 aA	0,74 aA	1,00 aA
	75 $\mu\text{M}$	1,05 aA	1,09 aA	0,76 aB	0,97 aA
80 mM	0 $\mu\text{M}$	0,90 bB	1,07 aA	0,73 bA	0,83 aB
	75 $\mu\text{M}$	1,07 aA	1,06 aA	0,83 aA	0,79 aB

Na ausência de pré-tratamento, a eficiência de transporte de Ca ( $ET_{Ca}$ ) aos 7 dias foi reduzida pelo estresse salino, mas, quando as plantas foram pré-tratadas com NPS a 75  $\mu\text{M}$ , essa variável manteve-se em valores equivalentes aos da condição controle (Tabela 3). Aos 14 dias, nem o pré-tratamento com NPS, nem a salinidade afetaram a  $ET_{Ca}$  das plantas, em ambas as condições de salinidade (Tabela 3). Aos 7 dias, o pré-tratamento com NPS não afetou a  $ET_{Mg}$  nas condições controle, porém, nas condições salinas, ele aumentou em 14% a  $ET_{Mg}$  das plantas (Tabela 3). Já aos 14 dias, a  $ET_{Mg}$  variou apenas em função da salinidade, sendo reduzida em 18%, em média (Tabela 3).

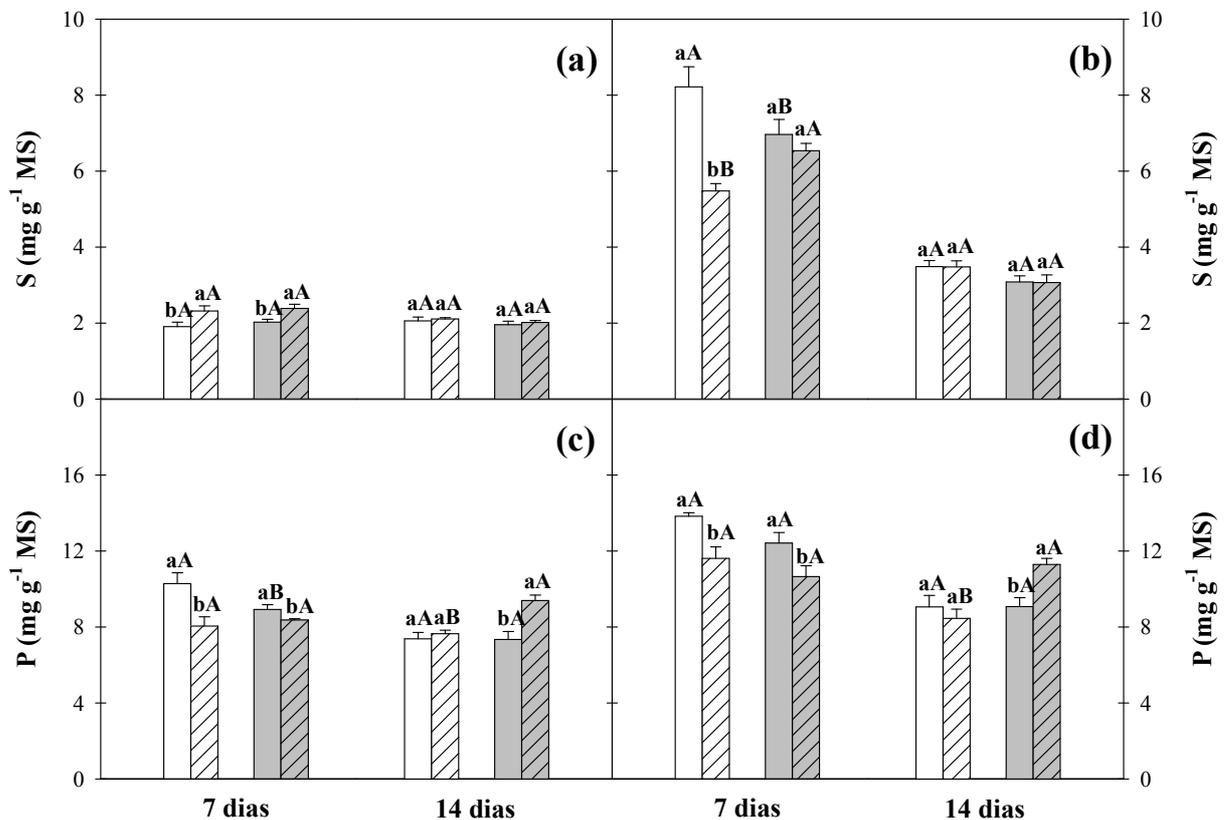
O Ca possui papel vital na regulação de vários processos fisiológicos da planta, os quais influenciam tanto o crescimento, quanto as respostas a estresses ambientais (HU;

SCHMIDHALTER, 2005). Além disso, esse nutriente também é requerido durante a síntese de novas paredes celulares e na estabilização da membrana plasmática (TAIZ; ZEIGER, 2009; MAATHUIS; DIATLOFF, 2013). O Mg, por sua vez, é componente da molécula de clorofila e cofator de quase todas as enzimas do metabolismo energético (MAATHUIS; DIATLOFF, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013). Vários estudos têm demonstrado que a salinidade acarreta redução dos teores de Ca em plantas de milho (CRAMER *et al.*, 1994; AZEVEDO NETO; TABOSA, 2000), bem como em outras espécies (MENEGUZZO; NAVARI-IZZO; IZZO, 2000; TUNA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2013) e isso parece decorrer da concentração elevada de Na no meio de cultivo e, conseqüentemente, na planta. O Na em excesso é capaz de deslocar o Ca da membrana plasmática, causando perda da integridade celular e vazamento de eletrólitos, e inibe a absorção de Ca, uma vez que ambos compartilham sítios de absorção na raiz (GRATTAN; GRIEVE, 1992; DUMAN, 2012). Poucos estudos tratam dos efeitos da salinidade sobre os teores de Mg nas plantas, apesar da importância desse nutriente para o metabolismo vegetal, e nesses casos houve respostas controversas, em que eles tanto aumentaram, quanto reduziram nas condições salinas (AZEVEDO NETO; TABOSA, 2000; LIU *et al.*, 2013).

Neste experimento, o pré-tratamento das plantas de milho com NPS a 75  $\mu\text{M}$  aumentou a absorção de Ca nas condições salinas, o qual se acumulou preferencialmente na parte aérea, mas esse efeito foi restrito apenas aos 7 primeiros dias de estresse (Figura 9 e Tabela 3). Liu *et al.* (2013) observaram que a aplicação foliar de NPS a 90  $\mu\text{M}$  também foi capaz de elevar os teores de Ca em algodoeiro sob estresse salino, contudo a razão pelo qual isso ocorreu não foi apresentada por eles. Uma vez que o NO induz a atividade das  $\text{H}^+$ -ATPases de membrana plasmática (ZHANG *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2010), e que essas bombas são essenciais para o transporte de múltiplos íons (PALMGREN; HARPER, 1999), pode-se sugerir que um aumento similar contribuiu para a maior absorção de Ca nas plantas de milho sob estresse salino.

Sabe-se que há uma forte competição entre o Ca e o Mg pelos sítios de ligação à membrana plasmática e que plantas crescendo em meios com concentração elevada de Ca tendem a apresentar teores reduzidos de Mg (MARSCHNER, 1995; DUMAN, 2012). É provável que essa tenha sido a razão pela qual, aos 7 dias, as plantas pré-tratadas com NPS e sob estresse absorveram menos Mg e o acumularam nas raízes, onde os teores de Ca foram baixos, em comparação aos da parte aérea das plantas (Figura 9 e Tabela 3). Ademais, aos 14 dias, as plantas sob estresse absorveram menos Mg que aquelas nas condições controle, e elas o mantiveram preferencialmente nas raízes.

Os teores de S na parte aérea das plantas de milho não variaram significativamente em função do estresse salino, em ambos os tempos analisados, e foram afetados pelo pré-tratamento com NPS apenas aos 7 dias, ocasião em que aumentaram, independentemente do nível de salinidade (Figura 10a). Os teores de S nas raízes variaram significativamente apenas aos 7 dias, quando então sofreram redução, nas condições controle, ou não variaram significativamente, nas condições salinas, em razão do pré-tratamento com NPS (Figura 10b). Aos 7 dias, os teores de P na parte aérea e nas raízes das plantas de milho foram reduzidos pelo pré-tratamento com NPS, seja nas condições controle, seja nas condições salinas. Já aos 14 dias, o pré-tratamento com NPS induziu aumento dos teores de P nas plantas sob estresse salino, que foi observado tanto na parte aérea, quanto nas raízes (Figura 10c e 10d).



**Figura 10.** Teores de S e P na parte aérea (a, c) e nas raízes (b, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75 µM (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

A eficiência de absorção de S foi reduzida pela salinidade, em ambos os tempos analisados, não tendo havido, contudo, alterações significativas nessa variável em resultado do pré-tratamento com NPS (Tabela 4). Aos 7 dias, as plantas sob estresse salino apresentaram redução na eficiência de absorção de P ( $EA_P$ ), em relação às plantas controle, e o pré-tratamento com NPS não resultou em qualquer efeito de melhora nessa variável (Tabela 4). Já aos 14 dias, o pré-tratamento com NPS reverteu a redução na  $EA_P$  decorrente do estresse salino, igualando-a àquela das plantas controle (Tabela 4). A eficiência de transporte de S ( $ET_S$ ) foi aumentada nas plantas pré-tratadas com NPS, aos 7 dias, nas condições controle, e não se observaram quaisquer alterações significativas na  $ET_S$  das plantas aos 14 dias (Tabela 4). A eficiência de transporte de P ( $ET_P$ ) não foi afetada por quaisquer dos tratamentos empregados (Tabela 4).

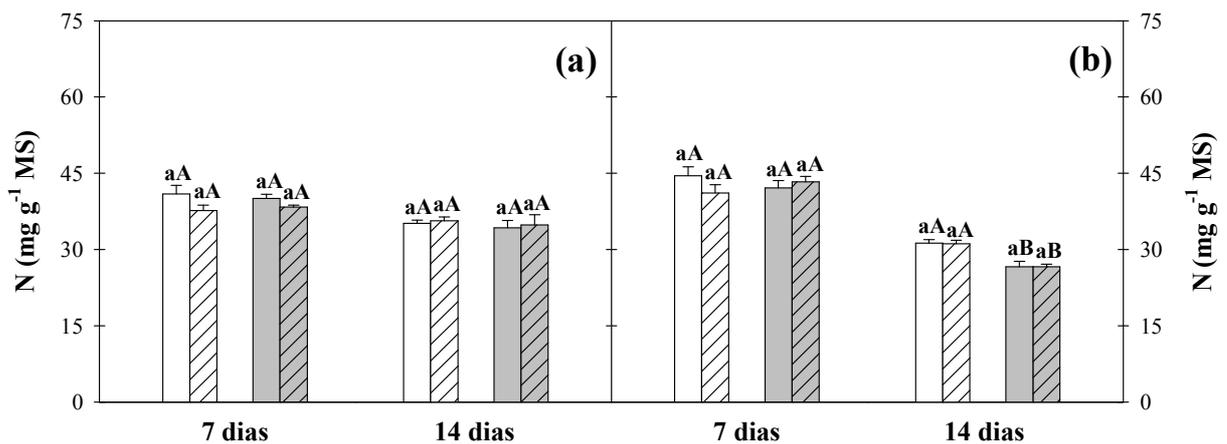
**Tabela 4.** Eficiências de absorção (EA) e de transporte (ET) de S ( $EA_S$ ;  $ET_S$ ) e P ( $EA_P$ ;  $ET_P$ ) em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

NaCl	NPS	$EA_S$		$EA_P$	
		(mg nutriente $\text{g}^{-1}$ massa seca de raiz)			
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
0 mM	0 $\mu\text{M}$	19,25 aA	15,47 aA	69,42 aA	53,43 aA
	75 $\mu\text{M}$	17,84 aA	16,52 aA	54,80 bA	55,82 aA
80 mM	0 $\mu\text{M}$	13,71 aB	11,56 aB	37,58 aB	44,18 bB
	75 $\mu\text{M}$	13,77 aB	12,74 aB	43,86 aB	55,80 aA
NaCl	NPS	$ET_S$		$ET_P$	
		(mg nutriente parte aérea $\text{mg}^{-1}$ nutriente planta)			
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
0 mM	0 $\mu\text{M}$	0,66 bA	0,89 aA	0,94 aA	0,95 aA
	75 $\mu\text{M}$	0,82 aA	0,92 aA	0,93 aA	0,98 aA
80 mM	0 $\mu\text{M}$	0,64 bA	0,91 aA	0,91 aA	0,96 aA
	75 $\mu\text{M}$	0,67 aB	0,89 aA	0,91 aA	0,98 aA

O S é encontrado em dois aminoácidos proteicos, a cisteína e a metionina, e é constituinte de várias vitaminas e coenzimas essenciais ao metabolismo celular (TAIZ;

ZEIGER, 2013). Além disso, é constituinte de sulfolipídios, uma classe de lipídios de membrana encontrada principalmente nos tilacoides, e da glutathiona, um composto antioxidante envolvido na homeostase redox da célula (MAATHUIS; DIATLOFF, 2012). Já o P é componente de vários compostos celulares, como os açúcares-fosfato, que são intermediários do metabolismo fotossintético e respiratório, os fosfolipídios, que compõem as membranas biológicas, e do ATP e de outros nucleotídeos, envolvidos no metabolismo energético (MAATHUIS; DIATLOFF, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2009). Pouca atenção tem sido dada aos efeitos da salinidade sobre o metabolismo do S em plantas, mas se sabe que um fornecimento adequado de S protege as plantas contra os efeitos adversos da salinidade (ASTOLFI; ZUCHI, 2013). Em relação à interação entre P e salinidade, os estudos desenvolvidos até o momento frequentemente mostram resultados controversos, variando em função da espécie e das condições experimentais empregadas.

Os teores de N na parte aérea das plantas não foram afetados pela salinidade, nem pelo pré-tratamento com NPS, em ambos os tempos avaliados (Figura 11a). Nas raízes, os teores de N variaram significativamente apenas aos 14 dias, ocasião em que eles foram reduzidos nas plantas sob estresse salino, sem haver qualquer efeito resultante do pré-tratamento com NPS (Figura 11b). Não houve variações significativas nas eficiências de absorção ( $EA_N$ ) e transporte de N ( $ET_N$ ), à exceção da  $EA_N$  aos 7 dias, que foi reduzida pela salinidade (Tabela 5).



**Figura 11.** Teores de N na parte aérea (a) e nas raízes (b) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu$ M (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

**Tabela 5.** Eficiências de absorção (EA) e de transporte (ET) de N ( $EA_N$ ;  $ET_N$ ) em plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu\text{M}$  e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

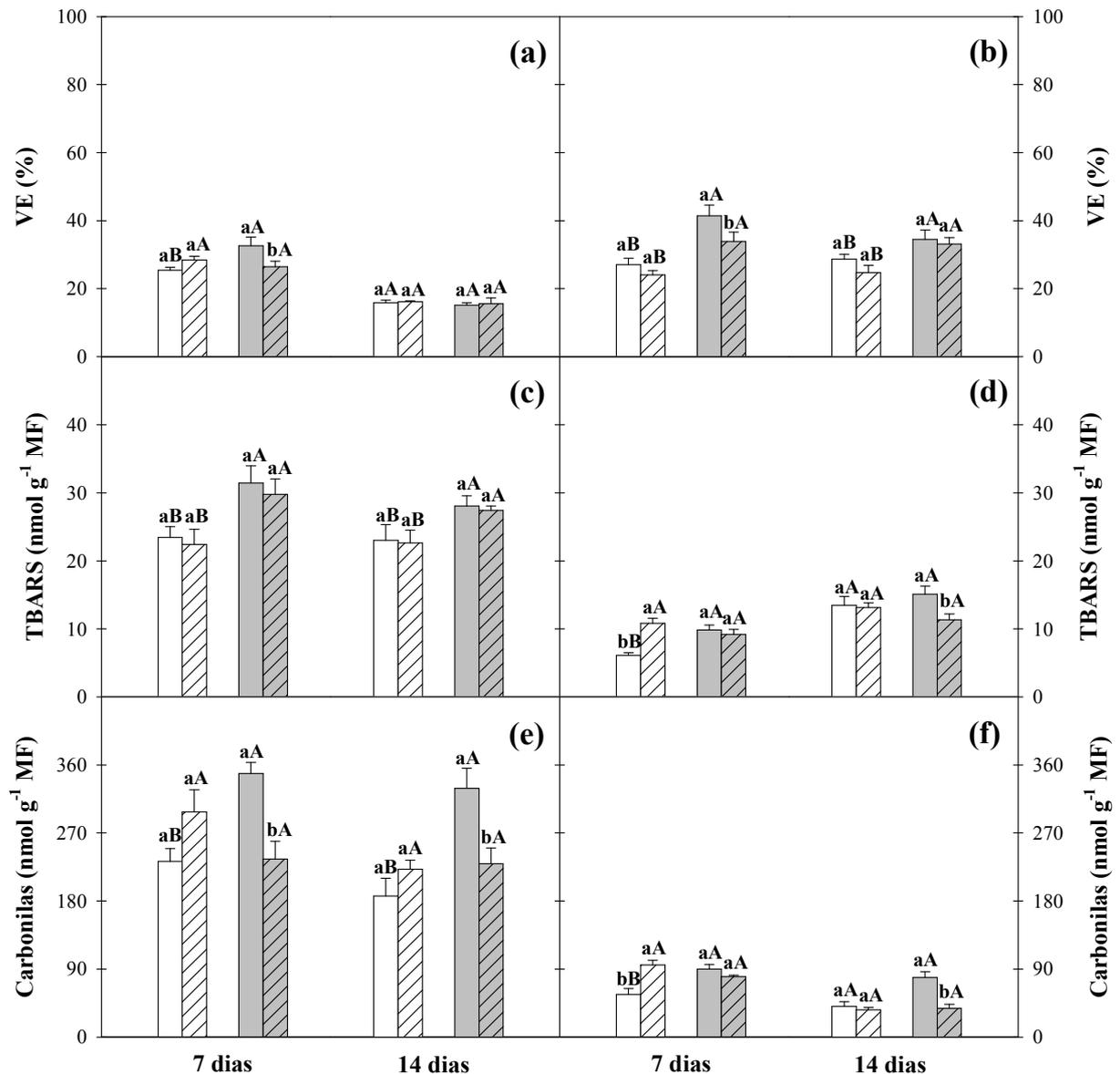
NaCl	NPS	$EA_N$		$ET_N$	
		(mg N g <sup>-1</sup> massa seca de raiz)		(mg N parte aérea mg <sup>-1</sup> N planta)	
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
0 mM	0 $\mu\text{M}$	260,28 aA	209,57 aA	0,99 aA	1,02 aA
	75 $\mu\text{M}$	233,07 aA	251,28 aA	0,97 aA	1,02 aA
80 mM	0 $\mu\text{M}$	164,78 aB	174,56 aA	0,99 aA	1,04 aA
	75 $\mu\text{M}$	172,09 aB	214,97 aA	0,98 aA	1,05 aA

O N é o elemento mineral que as plantas exigem em maior quantidade, servindo como constituinte de muitos componentes da célula vegetal, incluindo aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (HU; SCHMIDHALTER, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009). A despeito das intensas reduções que a salinidade causou nos teores de  $\text{NO}_3^-$ , os teores de N das plantas de milho permaneceram praticamente inalterados, demonstrando que a inibição da absorção desse nutriente não impactou o acúmulo de N.

### 3.2.3 Vazamento de eletrólitos, peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas e teores de $\text{H}_2\text{O}_2$ e $\cdot\text{O}_2^-$

A salinidade comumente causa danos às membranas celulares, os quais são constatados através de alterações na sua permeabilidade, nos seus componentes (lipídios e proteínas), no seu potencial elétrico ou ainda na atividade de enzimas associadas (MANSOUR, 2013). Uma das maneiras de se avaliar a permeabilidade da membrana é mensurando-se o VE, como feito neste experimento. Aos 7 dias, na ausência de pré-tratamento com NPS, houve um aumento no VE das folhas, em função da salinidade, mas esse efeito não foi observado nas plantas pré-tratadas, nas quais o VE foi significativamente menor, alcançando valores equivalentes aos da condição controle (Figura 12a). Aos 14 dias, não houve quaisquer alterações significativas no VE das folhas das plantas de milho. Nas raízes, aos 7 e 14 dias, o VE foi significativamente aumentado nas condições salinas, mas, no primeiro tempo de estresse, esse aumento foi menor nas plantas pré-tratadas com NPS (Figura 12b).

A peroxidação de lipídios é um parâmetro indicador de estresse oxidativo, mensurado a partir da estimativa dos teores de TBARS. Nas folhas, os teores de TBARS foram afetados apenas pelo estresse salino, que os aumentou em ambos os tempos avaliados (Figura 12c). Aos 7 dias, o pré-tratamento com NPS aumentou os teores radiculares de TBARS nas condições controle, mas não resultou em qualquer alteração significativa nas plantas sob estresse; aos 14 dias, houve uma redução nos teores radiculares de TBARS nas plantas sob estresse, induzida pelo pré-tratamento com NPS (Figura 12d).

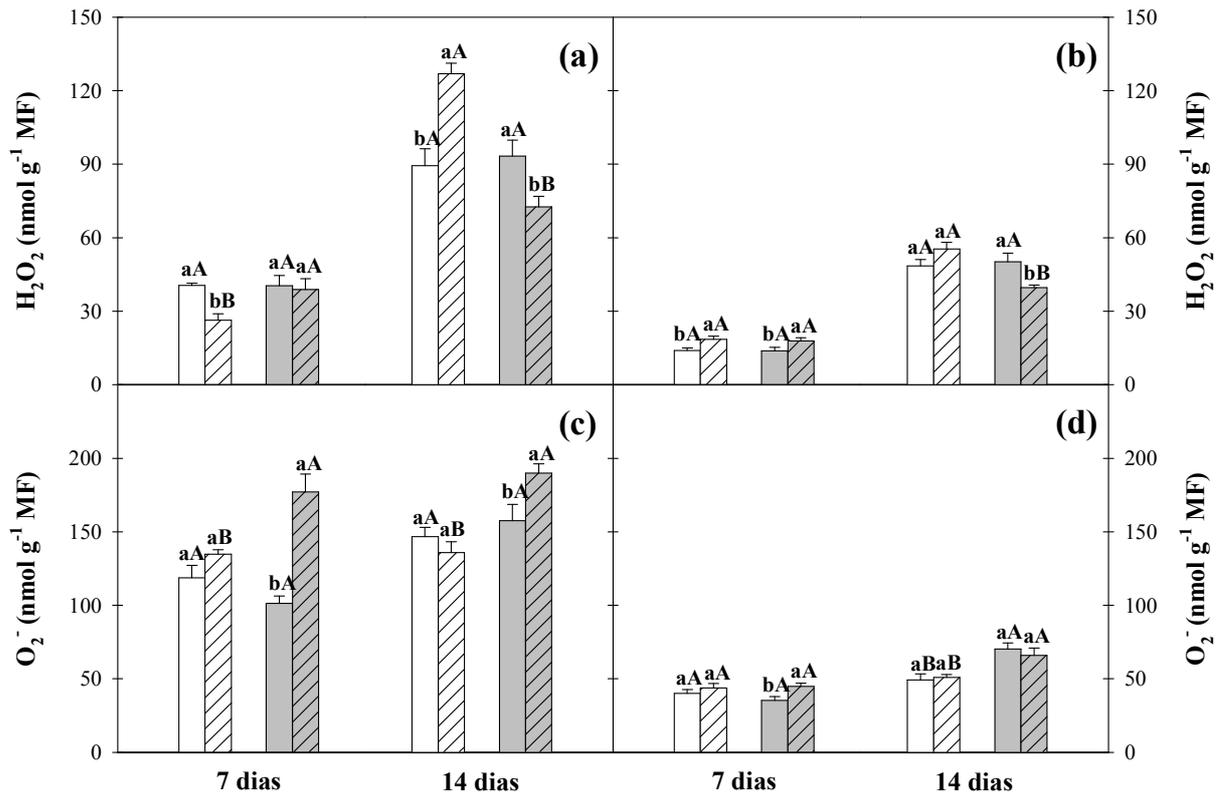


**Figura 12.** Vazamento de eletrólitos (VE), teores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e teores de grupos carbonila nas folhas (a, c, e) e nas raízes (b, d, f) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75 μM (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

A quantificação das proteínas carboniladas também é um indicador importante de estresse oxidativo. Na ausência de pré-tratamento, os teores de carbonilas nas folhas aumentaram significativamente com o estresse salino, mas isso foi amenizado ao se pré-tratar as plantas com NPS a 75  $\mu\text{M}$ , seja aos 7 dias, seja aos 14 dias de estresse (Figura 12e). Nas raízes, aos 7 dias, houve um aumento nos teores de carbonilas nas condições controle, que não foi observado nas condições salinas; já aos 14 dias, o pré-tratamento com NPS acarretou redução nos teores radiculares de carbonilas das plantas sob estresse salino (Figura 12f).

De modo geral, os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas folhas e nas raízes das plantas de milho não foram influenciados pela salinidade, mas o foram pelo pré-tratamento com NPS. Aos 7 dias, os teores foliares de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nas condições controle, foram reduzidos pelo pré-tratamento com NPS, mas não sofreram qualquer alteração significativa em função do pré-tratamento, nas condições salinas (Figura 13a). Aos 14 dias, o pré-tratamento com NPS aumentou os teores foliares de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nas condições controle, e os reduziu, nas condições salinas (Figura 13a). Nas raízes, aos 7 dias, o pré-tratamento com NPS elevou significativamente os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tanto nas condições controle, quanto nas de estresse (Figura 13b). Aos 14 dias, os teores radiculares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram afetados pelo pré-tratamento com NPS apenas nas plantas sob estresse, nas quais eles reduziram (Figura 13b). De modo geral, os teores foliares de  $\bullet\text{O}_2^-$  aumentaram significativamente nas plantas pré-tratadas com NPS e submetidas à salinidade. Nas raízes, aos 7 dias, houve uma resposta similar à das folhas; já aos 14 dias, os teores radiculares de  $\bullet\text{O}_2^-$  diferiram significativamente apenas em razão da salinidade, sendo aumentados quando as plantas estiveram sob estresse (Figura 13c e 13d).

Aumentos do VE em plantas sob estresse salino foram relatados anteriormente no milho (KAYA *et al.*, 2013) e em outras espécies (TUNA *et al.*, 2007; ALVAREZ-PIZARRO *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2011), e isso geralmente é acompanhado por um aumento da peroxidação dos lipídios de membrana. Apesar de o pré-tratamento com NPS ter sido capaz de reduzir o VE nas folhas e nas raízes das plantas de milho após 7 dias de estresse salino, os teores de TBARS nessas plantas não variaram significativamente, indicando que essa melhora esteve associada a outros fatores. Como dito anteriormente, o Ca é essencial para a manutenção da integridade da membrana plasmática, e uma vez que os teores desse elemento foram aumentados nas plantas pré-tratadas com NPS e submetidas à salinidade, pode-se sugerir que isso tenha contribuído para o menor VE dessas plantas aos 7 dias (Figuras 9 e 12). A redução do VE nas plantas pré-tratadas com NPS correlacionou-se bem com os teores de grupos carbonila nas folhas, aos 7 dias, indicando que houve uma menor oxidação das proteínas nessas condições (Figura 12).



**Figura 13.** Teores de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e superóxido ( $\bullet O_2^-$ ) nas folhas (a, c) e nas raízes (b, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu$ M (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

No presente experimento, aos 7 dias, a salinidade não alterou significativamente os teores de  $H_2O_2$  e  $\bullet O_2^-$  das plantas de milho, apesar de ter aumentado os teores de TBARS e carbonilas (Figuras 12 e 13). A peroxidação de lipídios e a oxidação de proteínas aumentadas devem-se geralmente a uma maior quantidade de ROS nas células, mas essa relação não pôde ser estabelecida a partir dos resultados observados neste experimento. Ainda nesse tempo, o pré-tratamento com NPS aumentou os teores de TBARS e carbonilas nas raízes, nas condições controle, e induziu acúmulo de  $\bullet O_2^-$  nas folhas, nas condições salinas. Por outro lado, aos 14 dias, a oxidação de proteínas foi o único parâmetro afetado pelo pré-tratamento com NPS, e isso foi acompanhado por uma redução no acúmulo de  $H_2O_2$  nas folhas e nas raízes das plantas pré-tratadas, nas condições salinas (Figuras 12 e 13). Diversos autores demonstraram a eficácia do NO na redução dos danos oxidativos e dos teores de ROS em plantas sob estresse (SHI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; SUNG; HONG, 2010; XU *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2011). Neste experimento, a avaliação desses indicadores de estresse oxidativo nas

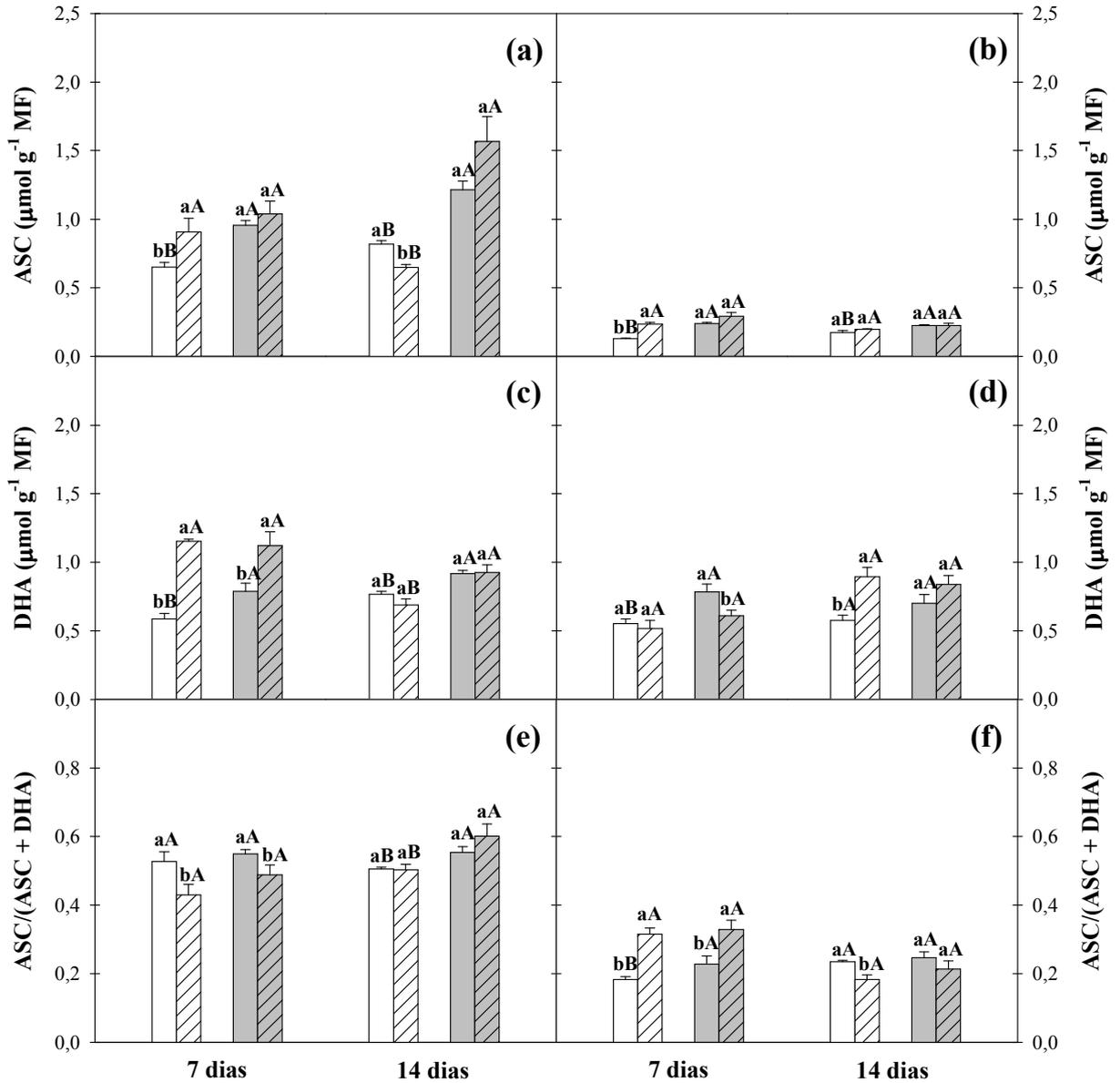
plantas de milho pré-tratadas com NPS rendeu resultados controversos, e isso provavelmente está relacionado à presença de um sistema antioxidativo pouco eficiente nessas plantas.

### 3.2.4 *Ascorbato e glutationa*

Nas condições controle, os teores foliares de ASC aos 7 dias aumentaram com o pré-tratamento das plantas; por outro lado, nas condições salinas, os teores foliares desse composto não diferiram significativamente, ao se comparar as plantas pré-tratadas com as não pré-tratadas (Figura 14a). Além disso, na ausência de pré-tratamento, as plantas sob estresse salino mantiveram teores de ASC maiores que aqueles das plantas controle, mas essa resposta não foi observada nas plantas pré-tratadas com NPS (Figura 14a). Aos 14 dias, o estresse salino aumentou os teores foliares de ASC, os quais foram afetados pelo pré-tratamento com NPS apenas nas condições controle, em que reduziram, quando comparados aos das plantas não pré-tratadas (Figura 14a). Na raiz, aos 7 dias, houve um aumento nos teores de ASC nas condições controle, quando as plantas foram pré-tratadas com NPS, uma resposta semelhante, portanto, àquela observada para as folhas (Figura 14b). Os teores radiculares de ASC pouco variaram, seja em função do estresse salino, seja em função do pré-tratamento com NPS (Figura 14b).

Os teores foliares de DHA, aos 7 dias, foram significativamente aumentados pelo pré-tratamento com NPS, tanto nas condições controle, quanto nas condições salinas (Figura 14c). Aos 14 dias, os teores foliares de DHA variaram apenas em decorrência da salinidade, os quais foram aumentados nessa condição (Figura 14c). Na raiz, aos 7 dias, a salinidade aumentou os teores de DHA nas plantas sob estresse, contudo o pré-tratamento com NPS reduziu esses teores para níveis comparáveis aos das plantas controle (Figura 14d). Aos 14 dias, o pré-tratamento com NPS afetou os teores radiculares de DHA apenas nas condições controle, aumentando-os (Figura 14d).

A razão  $ASC/(ASC + DHA)$ , que representa o *status* redox do ascorbato, foi reduzida nas folhas, aos 7 dias, em função do pré-tratamento das plantas, tanto nas condições controle, quanto nas condições salinas, não havendo nesse caso qualquer efeito do estresse salino (Figura 14e). Já aos 14 dias, a razão  $ASC/(ASC + DHA)$  nas folhas foi afetada apenas pela salinidade, sendo aumentada nessa condição (Figura 14e). A razão  $ASC/(ASC + DHA)$  na raiz, aos 7 dias, foi aumentada pelo pré-tratamento com NPS, tanto nas condições controle, quanto nas condições salinas; aos 14 dias, o pré-tratamento reduziu essa razão apenas nas plantas controle, e não houve qualquer efeito do estresse salino nesse tempo (Figura 14f).



**Figura 14.** Teores de ascorbato reduzido (ASC) e oxidado (DHA) e *status* redox do ascorbato [ASC/(ASC + DHA)] nas folhas (a, c, e) e nas raízes (b, d, f) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu\text{M}$  (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

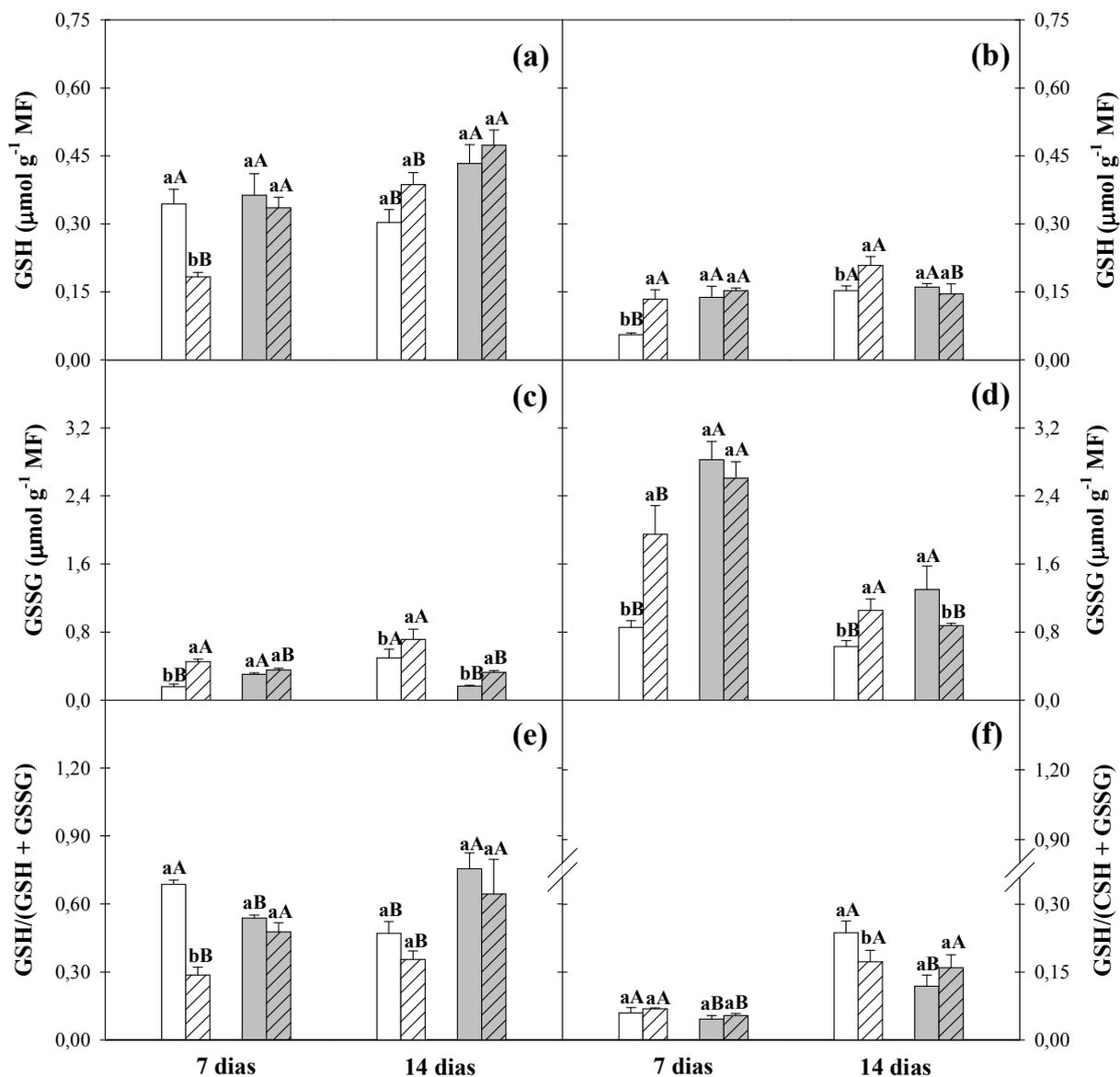
Ao analisar as alterações ocorridas nos teores de ASC e DHA nas folhas, aos 7 dias, pôde-se constatar que o estresse salino afetou essas variáveis apenas na ausência do pré-tratamento com NPS (Figura 14), o qual elevou os teores de ascorbato total (dados não apresentados). Nesse tempo, a redução do *status* redox do ascorbato nas folhas foi acarretada por um aumento nos teores de DHA, que implica ter havido maior ação antioxidante do ASC nessas condições ou ainda sua maior utilização pela APX. Aos 14 dias, os teores aumentados de ascorbato nas folhas decorreram principalmente do estresse salino, e isso foi mais evidente nos teores de ASC, acarretando um *status* redox aumentado, em comparação às condições controle.

Na raiz, o *status* redox do ascorbato nas plantas pré-tratadas com NPS não diferiu em função do estresse salino, aos 7 dias, mas isso se deveu a razões distintas, pois, nas condições controle, houve um maior acúmulo de ASC que de DHA, enquanto que, nas condições salinas, houve redução apenas nos teores de DHA. Aos 14 dias, a redução causada pelo estresse salino no *status* redox do ascorbato foi resultante de teores aumentados de DHA.

Alguns estudos têm demonstrado que o estresse salino acarreta diminuição dos teores de ascorbato em espécies ou cultivares sensíveis à salinidade (HERNÁNDEZ *et al.*, 2001; SHALATA *et al.*, 2001; MITTOVA *et al.*; 2003, 2004). Tais reduções não ocorreram neste experimento, apesar de o BR 5011 ser considerado uma variedade de milho sensível à salinidade; de fato, os teores de ascorbato aumentaram nas condições salinas, mas o papel do pré-tratamento das plantas com NPS foi pouco evidente nesse processo. Christou, Mangararis e Fotopoulos (2014) observaram indução da expressão de genes associados à biossíntese de ascorbato em plantas de morango pré-tratadas com NPS a 100  $\mu\text{M}$  e submetidas à salinidade (NaCl a 100 mM); baseando-se nisso, é possível sugerir que algo semelhante ocorreu nas plantas de milho, neste experimento, uma vez que os teores foliares de ascorbato total aos 7 dias foram significativamente elevados com o pré-tratamento com NPS.

Com exceção das plantas não pré-tratadas, a salinidade aumentou os teores foliares de GSH aos 7 dias. Além disso, o pré-tratamento com NPS reduziu os teores foliares de GSH, nas condições controle, e não acarretou qualquer efeito significativo sobre eles, nas condições salinas (Figura 15a). Aos 14 dias, os teores foliares de GSH aumentaram significativamente em razão da salinidade, não havendo, nesse tempo, qualquer efeito significativo do pré-tratamento sobre essa variável (Figura 15a). Nas raízes, os teores de GSH, aos 7 dias, foram aumentados pelo estresse salino apenas nas plantas não pré-tratadas; nesse mesmo tempo, o pré-tratamento com NPS elevou os teores de GSH nas condições controle, mas não alterou significativamente essa variável nas condições salinas (Figura 15b). Aos 14

dias, os teores radiculares de GSH aumentaram apenas nas condições controle, em razão do pré-tratamento com NPS, mas a salinidade reduziu-os significativamente, nas plantas pré-tratadas (Figura 15b).



**Figura 15.** Teores de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e *status* redox da glutatona [GSH/(GSH + GSSG)] nas folhas (a, c, e) e nas raízes (b, d, f) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu\text{M}$  (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

Os teores foliares de GSSG foram reduzidos pela salinidade aos 7 e 14 dias, com exceção das plantas não pré-tratadas aos 7 dias, nas quais eles aumentaram com a salinidade (Figura 15c). Aos 7 dias, os teores foliares de GSSG, nas condições controle, foram significativamente aumentados pelo pré-tratamento com NPS, mas isso não ocorreu nas condições salinas, nas quais houve uma redução desses teores, nas plantas pré-tratadas com NPS (Figura 15c). Aos 14 dias, o pré-tratamento com NPS aumentou os teores foliares de GSSG, independentemente da condição de salinidade a que as plantas estiveram submetidas (Figura 15c). Nas raízes, de modo geral, os teores de GSSG aumentaram com o estresse salino, e eles foram afetados pelo pré-tratamento com NPS apenas nas condições controle, em que aumentaram significativamente, em relação às plantas não pré-tratadas (Figura 15d).

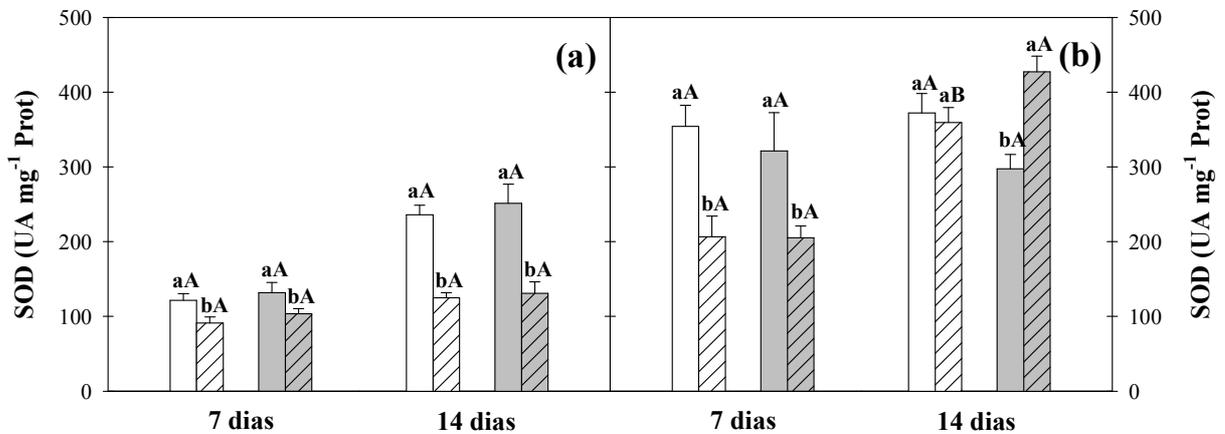
A razão  $GSH/(GSH + GSSG)$  nas folhas, aos 7 dias, foi drasticamente reduzida pelo pré-tratamento com NPS, nas condições controle, porém, quando as plantas estiveram sob estresse salino, não houve qualquer alteração significativa nessa variável, em decorrência do pré-tratamento (Figura 15e). Aos 14 dias, a salinidade aumentou a razão  $GSH/(GSH + GSSG)$ , independentemente de as plantas terem sido pré-tratadas ou não (Figura 15e). De modo geral, a razão  $GSH/(GSH + GSSG)$  nas raízes foi reduzida pela salinidade, e o pré-tratamento resultou em pouco ou nenhum efeito sobre essa razão nas plantas de milho (Figura 15f).

A redução do *status* redox da glutathiona nas folhas, aos 7 dias, nas plantas sob estresse, foi ditada principalmente pelo aumento dos teores de GSSG, e uma resposta similar a essa ocorreu nas raízes dessas plantas, nesse mesmo tempo (Figura 15). Aos 14 dias, o *status* redox da glutathiona aumentado nas folhas, nas condições salinas, derivou de aumentos nos teores de GSH e redução nos teores de GSSG, enquanto que, nas raízes, as alterações no *status* redox da glutathiona, nas condições salinas, foram ditadas principalmente pelos teores de GSSG. Assim como com o ascorbato, o papel do pré-tratamento das plantas com NPS no metabolismo da glutathiona foi pouco evidente.

### **3.2.6 Enzimas antioxidantes**

A atividade da SOD nas folhas não foi afetada pelo estresse salino, mas reduziu significativamente em razão do pré-tratamento com NPS, tanto nas condições controle, quanto nas condições salinas, e em quaisquer tempos analisados (Figura 16a). Uma resposta semelhante a essa também foi observada nas raízes das plantas após 7 dias de estresse; já aos 14 dias, a atividade da SOD nas raízes foi reduzida nas condições salinas, mas o pré-

tratamento com NPS reverteu esse quadro, elevando-a a valores significativamente maiores que nas plantas controle e pré-tratadas (Figura 16b).



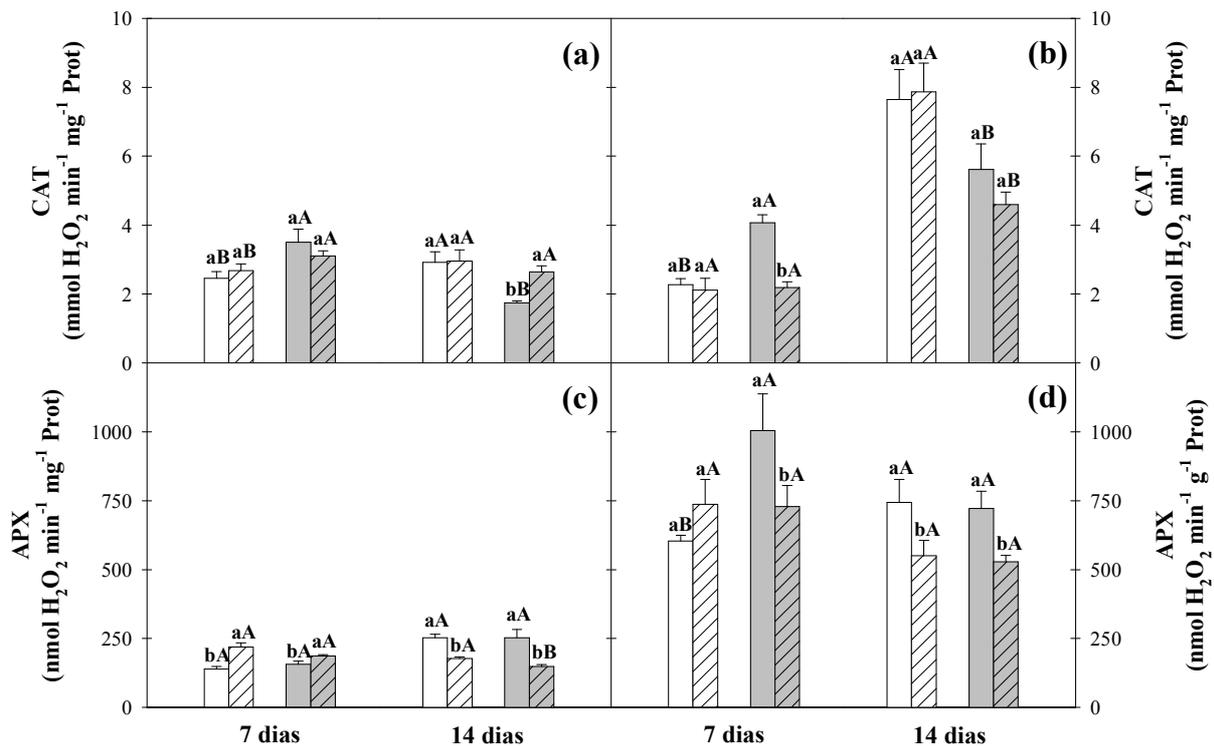
**Figura 16.** Atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) nas folhas (a) e nas raízes (b) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu\text{M}$  (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

A SOD é uma enzima ubíqua em organismos aeróbicos e possui um papel-chave na defesa contra os danos causados pelas ROS, uma vez que sua atividade modula os níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, por conseguinte, diminui os riscos de formação do radical  $\bullet\text{OH}$  (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Neste experimento, o estresse salino não afetou a atividade da SOD nas folhas e a reduziu nas raízes, mas essa resposta varia com a espécie e com as condições experimentais; geralmente a atividade da SOD aumenta em cultivares ou espécies tolerantes à salinidade e diminui naqueles considerados sensíveis (AZEVEDO NETO *et al.*, 2006). De modo geral, a atividade da SOD foi diminuída nas plantas pré-tratadas com NPS, e esse foi um resultado inesperado, pois, via de regra, a atividade dessa enzima tem aumentado em plantas pré-tratadas com NPS, sob diferentes condições adversas (SHI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010). Tal atividade reduzida correlacionou-se com o aumento nos teores de  $\bullet\text{O}_2^-$  nas plantas pré-tratadas e sob estresse, especialmente nas folhas, e pode explicar em parte a pouca ou nenhuma alteração dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nesses órgãos, aos 7 dias de estresse.

A atividade da CAT nas folhas foi aumentada pelo estresse salino aos 7 dias, sem ter havido, contudo, qualquer efeito significativo do pré-tratamento com NPS sobre essa variável (Figura 17a). Aos 14 dias, o estresse salino reduziu a atividade da CAT nas folhas, mas isso foi revertido quando as plantas foram pré-tratadas com NPS (Figura 17a). Nas raízes,

o estresse salino aumentou a atividade da CAT aos 7 dias, mas o pré-tratamento com NPS a reduziu, nessas mesmas condições de salinidade (Figura 17b). Aos 14 dias, não houve quaisquer alterações na atividade da CAT em decorrência do pré-tratamento com NPS, a qual foi reduzida apenas em função da salinidade (Figura 17b).

A atividade da APX foi aumentada nas folhas das plantas após 7 dias, como consequência do pré-tratamento com NPS, mas não houve qualquer alteração significativa nessa variável em decorrência do estresse salino (Figura 17c). Aos 14 dias, contrariamente, a atividade da APX nas folhas foi reduzida pelo pré-tratamento com NPS, tanto nas condições controle, quanto nas condições salinas (Figura 17c). A atividade da APX nas raízes, aos 7 dias, foi aumentada pelo estresse salino na ausência de pré-tratamento com NPS, e ela não variou significativamente nas plantas pré-tratadas (Figura 17d). Enquanto isso, aos 14 dias, a atividade da APX foi reduzida significativamente em decorrência do pré-tratamento com NPS, não sendo afetada pela salinidade (Figura 17d).



**Figura 17.** Atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) nas folhas (a, c) e nas raízes (b, d) de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 (sem hachura) ou 75  $\mu\text{M}$  (com hachura) e cultivadas durante 7 ou 14 dias na ausência (colunas brancas) ou na presença (colunas cinza) de NaCl a 80 mM. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de NPS, ou por letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado após a atividade da SOD ainda é tóxico e precisa ser eliminado pela conversão a H<sub>2</sub>O em reações subsequentes, e as principais enzimas associadas a essa remoção são a CAT e a APX. Aos 7 dias, o aumento de atividade da CAT, nas condições salinas, pode ter contribuído para a manutenção dos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os quais não variaram com a salinidade (Figuras 13 e 17). Comparativamente, a CAT foi a mais eficiente na remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois ela apresentou uma taxa de remoção dessa molécula muito maior que a da APX.

Em muitos estudos, têm-se observado o envolvimento do NO na resposta antioxidante, através da modulação da atividade das enzimas removedoras de ROS (WANG *et al.*, 2004). Neste estudo, de maneira geral, o pré-tratamento com NPS não afetou marcadamente a atividade das enzimas CAT e APX, diferindo, portanto, de outros estudos, em que o NO exógeno induziu aumento da atividade dessas enzimas antioxidantes (WANG *et al.*, 2004; FAN *et al.*, 2007; TUNCZ-OZDEMIR *et al.*, 2009).

### **3.2.6 Análises proteômicas nas folhas**

Aos 7 dias, a expressão das diferentes proteínas identificadas foi diminuída pelo estresse salino, na ausência do pré-tratamento com NPS, e esse percentual de redução variou de 31,5% (ID 7 – um fragmento de uma proteína transferidora de lipídios) a 67,1% (ID 20 – uma subunidade menor da Rubisco) (Tabela 6). Nas condições controle, o pré-tratamento das plantas com NPS pouco influenciou a expressão das proteínas identificadas; nessas condições, 06 proteínas foram subexpressas (ID's 2, 3, 14, 19, 20 e 21) e 01 proteína foi superexpressa (ID 8) (Tabela 6). O pré-tratamento com NPS a 75 µM induziu a superexpressão de várias proteínas que antes haviam sido subexpressas nas condições salinas; os maiores aumentos de expressão foram observados para as proteínas de ID's 5 e 11 (101,5% e 95,7%, respectivamente) (Tabela 6). Por fim, nas plantas pré-tratadas com NPS, a maioria das proteínas identificadas também foi subexpressa sob estresse salino (Tabela 6).

Aos 14 dias, o estresse salino não alterou a expressão da maioria das proteínas identificadas, diferindo, portanto, do que ocorreu aos 7 dias. (Tabela 7). Nas condições controle, o pré-tratamento das plantas com NPS causou superexpressão da maioria das proteínas identificadas; o maior aumento de expressão foi observado em uma proteína transportadora de lipídios (ID 41; 322,0%), seguido de um componente proteico do centro de reação do fotossistema I (ID 33; 140,3%). Essas duas proteínas também foram as que mais aumentaram nas condições salinas, em função do pré-tratamento com NPS, e exemplificam o

**Tabela 6.** Proteínas diferencialmente expressas em folhas de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu$ M e cultivadas durante 7 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.

Proteína ID	Identificação	C x S	C x C-NPS	S x S-NPS	C-NPS x S-NPS
1	Adenylate kinase chloroplastic	49,1	nd	82,5	nd
2	ATP synthase subunit alpha chloroplastic	65,7	57,2	84,2	32,4
3	ATP synthase subunit beta	64,4	46,9	71,9	nd
4	Germin like protein	54,5	nd	nd	42,7
5	Non specific lipid transfer protein	39,3	nd	101,5	39,4
6	Non specific lipid transfer protein	47,7	nd	64,9	32,4
7	Non specific lipid transfer protein Fragment	31,5	nd	nd	55,1
8	Non specific lipid transfer protein Fragment	54,7	35,0	70,8	49,7
9	Oxygen evolving enhancer protein 1	59,0	nd	42,1	33,6
10	Oxygen evolving enhancer protein 3 1	60,0	nd	82,0	32,6
11	Oxygen evolving enhancer protein 3 1 chloroplastic	63,5	nd	95,7	34,8
12	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	49,3	nd	nd	nd
13	Peroxiredoxin 5	48,0	nd	nd	46,7
14	Photosystem I iron sulfur center	49,6	29,0	66,7	nd
15	Photosystem I reaction center subunit II	49,3	nd	nd	28,6
16	Photosystem I reaction center subunit IV A	43,0	nd	nd	38,5
17	Photosystem I reaction center subunit IV A	49,2	nd	nd	nd
18	Putative thioredoxin superfamily protein	46,7	nd	nd	39,8
19	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	61,6	32,9	78,6	nd
20	Ribulose biphosphate carboxylase small chain chloroplastic	67,1	30,3	68,6	nd
21	Superoxide dismutase Cu Zn	52,1	35,7	53,7	nd
22	Superoxide dismutase Cu Zn 2	43,4	nd	41,1	nd
23	Superoxide dismutase Cu Zn 4A	67,1	nd	49,0	35,6

Marcações em vermelho ou azul correspondem respectivamente a proteínas que foram subexpressas ou superexpressas, e o percentual com que elas foram alteradas encontra-se no interior de cada célula. nd: não diferencial; C: ausência de NaCl a NPS; S: presença de NaCl e ausência de NPS; C-NPS: ausência de NaCl e presença de NPS; S-NPS: presença de NaCl e NPS.

**Tabela 7.** Proteínas diferencialmente expressas em folhas de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75  $\mu$ M e cultivadas durante 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.

Proteína ID	Identificação	C x S	C x C-NPS	S x S-NPS	C-NPS x S-NPS
24	Oxygen evolving enhancer protein 1	nd	132,8	62,0	nd
25	ATP synthase subunit beta	57,6	79,7	51,6	nd
26	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	nd	nd	50,7	nd
27	Photosystem I iron sulfur center	nd	50,6	nd	32,8
28	Oxygen evolving enhancer protein	nd	58,2	122,9	47,2
29	Non specific lipid transfer protein Fragment	201,5	61,2	88,6	78,7
30	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	nd	nd	nd	92,2
31	Photosystem I reaction center subunit IV	nd	140,3	180,0	nd
32	Photosystem I reaction center subunit IV	nd	124,2	115,9	nd
33	Photosystem I reaction center subunit II	nd	87,0	59,0	nd
34	Superoxide dismutase Cu Zn 4A	nd	128,6	nd	48,8
35	Superoxide dismutase Cu Zn Fragment	nd	80,3	111,6	nd
36	Oxygen evolving enhancer protein 3 1 chloroplastic	nd	55,6	45,5	nd
37	Fructose bisphosphate aldolase	68,4	nd	nd	nd
38	ATP synthase subunit alpha chloroplastic	59,4	56,3	nd	nd
39	Non specific lipid transfer protein Fragment	nd	322,0	222,7	nd

Marcações em vermelho ou azul correspondem respectivamente a proteínas que foram subexpressas ou superexpressas, e o percentual com que elas foram alteradas encontra-se no interior de cada célula. nd: não diferencial; C: ausência de NaCl a NPS; S: presença de NaCl e ausência de NPS; C-NPS: ausência de NaCl e presença de NPS; S-NPS: presença de NaCl e NPS.

efeito indutor de superexpressão ocorrido na maior parte das proteínas, acarretado pelo pré-tratamento com NPS (Tabela 7). Embora a expressão das proteínas identificadas tenha sido pouco afetada pelo estresse salino nas plantas pré-tratadas com NPS, houve, interessante, superexpressão da enzima carboxilase do fosfoenolpiruvato (Tabela 7).

Nas folhas, várias proteínas relacionadas à fotossíntese foram expressas diferencialmente em decorrência do estresse salino, bem como do pré-tratamento com NPS (Tabelas 6 e 7). Entre elas, estiveram presentes proteínas do complexo de evolução do oxigênio, proteínas que compõem o centro de reação do fotossistema I e a subunidade menor da carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bifosfato (Rubisco) (Tabelas 6 e 7). Como visto, a fotossíntese foi afetada pela salinidade e o pré-tratamento com NPS atenuou esse efeito adverso. Uma das razões pelas quais a *A* não foi afetada pela salinidade, nas plantas pré-tratadas com NPS, pareceu ter sido a indução da expressão de proteínas relacionadas ao processo fotossintético, como a subunidade menor da Rubisco, aos 7 dias, e subunidades do centro de reação do fotossistema I, aos 14 dias, e é provável que outras proteínas também tenham sido afetadas, mas que não foram identificadas neste estudo. Outras proteínas diferencialmente expressas nas folhas e que merecem destaque foram as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da sintase do ATP cloroplastidial, proteínas transportadoras de lipídios inespecíficas e uma das isoformas da enzima dismutase do superóxido (Cu-Zn SOD) (Tabelas 6 e 7).

### **3.2.7 Análises proteômicas nas raízes**

Aos 7 dias, a expressão da maioria das proteínas identificadas nas raízes não foi afetada pelo estresse salino; nessas condições, cinco proteínas foram subexpressas (ID's 54, 55, 63,65 e 69), com reduções variando de 29,27% a 82,49%, e apenas uma foi superexpressa (ID 68), a qual aumentou 200% (Tabela 8). Nas condições controle, o pré-tratamento com NPS reduziu a expressão de várias proteínas, incluindo diversas peroxidases; houve ainda superexpressão de duas proteínas, e uma delas foi uma PR-10 (ID 66), que aumentou 66%. Já nas condições salinas, o pré-tratamento com NPS surtiu pouco efeito na expressão proteica; nesse caso, apenas algumas peroxidases (ID's 59, 64 e 65) foram subexpressas, enquanto quatro proteínas foram superexpressas (Tabela 8). Nas plantas pré-tratadas com NPS, o estresse salino pouco influenciou a expressão das proteínas.

Aos 14 dias, as alterações na expressão das proteínas na raiz, decorrentes dos tratamentos, diferiram completamente daquelas ocorridas aos 7 dias. (Tabela 9). Houve a superexpressão de várias proteínas devido ao estresse salino, na ausência de pré-tratamento,

incluindo algumas enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo (Tabela 9). O pré-tratamento com NPS também acarretou a superexpressão de certas proteínas, com aumentos variando de 43,8% (ID 89) a 165,4% (ID 79) (Tabela 9). Nas condições salinas, o pré-tratamento com NPS resultou na subexpressão da maioria das proteínas identificadas, à exceção de 01 proteína (ID 79), cuja expressão aumento 150% (Tabela 9). Por fim, nas plantas pré-tratadas, a maioria das proteínas foram subexpressas em decorrência da salinidade.

Nas raízes, as proteínas expressas diferencialmente estiveram relacionadas principalmente ao metabolismo oxidativo (peroxidases diversas e a dismutase do superóxido, por exemplo) e com o metabolismo de carboidratos (isomerase da triose fosfato, aldolase e desidrogenase do malato); houve destaque também para algumas PR-proteínas, tanto aos 7 dias, quanto aos 14 dias (Tabelas 8 e 9).

**Tabela 8.** Proteínas diferencialmente expressas na raiz de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 µM e cultivadas durante 7 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.

Proteína ID	Identificação	C x S	C x C-NPS	S x S-NPS	C-NPS x S-NPS
40	Polyubiquitin 2	nd	nd	nd	66,67
41	Superoxide dismutase Cu Zn 2	nd	nd	nd	51,11
42	Glutamic acid and lysine rich protein	36,49	45,95	nd	nd
43	Methyl binding domain protein MBD109	43,59	33,33	109,09	76,92
44	Hsp20 alpha crystallin family protein	nd	56,93	nd	47,46
45	Triosephosphate isomerase cytosolic	nd	30,40	nd	nd
46	Putative methyl binding domain protein MBD105	nd	nd	40,00	nd
47	Peroxidase Fragment	nd	70,25	46,46	44,68
48	Non specific lipid transfer protein Fragment	nd	nd	94,29	nd
49	Fructose bisphosphate aldolase	nd	42,06	nd	nd
50	Anionic peroxidase	nd	29,06	nd	nd
51	Histone H4	60,12	48,81	nd	nd
52	Peroxidase 66	nd	67,67	67,65	nd
53	Peroxidase 1	29,27	68,90	40,52	nd
54	Pathogenesis related protein 10	nd	68,42	40,24	nd
55	Peroxidase 39	nd	68,18	nd	71,43
56	Malate dehydrogenase	200,00	100,00	nd	nd
57	Histone H4	82,49	32,77	135,48	38,66

Marcações em vermelho ou azul correspondem respectivamente a proteínas que foram subexpressas ou superexpressas, e o percentual com que elas foram alteradas encontra-se no interior de cada célula. nd: não diferencial; C: ausência de NaCl a NPS; S: presença de NaCl e ausência de NPS; C-NPS: ausência de NaCl e presença de NPS; S-NPS: presença de NaCl e NPS.

**Tabela 9.** Proteínas diferencialmente expressas nas raízes de plantas de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com NPS a 0 ou 75 µM e cultivadas durante 14 dias na ausência ou na presença de NaCl a 80 mM.

Proteína ID	Identificação	C x S	C x C-NPS	S x S-NPS	C-NPS x S-NPS
58	Versicolorin reductase	nd	nd	nd	73,9
59	Triosephosphate isomerase cytosolic	69,6	125,0	nd	nd
60	Superoxide dismutase Cu Zn	46,2	75,6	37,7	48,2
61	Superoxide dismutase Cu Zn	50,0	63,8	42,5	47,3
62	Superoxide dismutase Cu Zn Fragment	52,2	126,9	nd	48,0
63	Superoxide dismutase Cu Zn 2	56,8	nd	37,0	29,2
64	Peroxidase Fragment	103,8	nd	40,4	50,0
65	Peroxidase 66	65,7	nd	70,1	44,3
66	Peroxidase 39	46,1	nd	59,1	30,7
67	Peroxidase 2	nd	165,4	150,0	nd
68	Peroxidase 1	105,1	nd	55,6	nd
69	Pathogenesis related protein class I Fragment	nd	90,2	nd	51,3
70	Non specific lipid transfer protein	nd	nd	nd	34,1
71	Methyl binding domain protein MBD109	nd	59,3	nd	41,6
72	Malate dehydrogenase cytoplasmic	nd	120,0	nd	nd
73	Jasmonate induced protein	nd	nd	nd	45,2
74	Hsp20 alpha crystallin family protein	91,8	nd	58,3	nd
75	Glutamic acid and lysine rich protein	46,2	nd	nd	nd
76	Fructose bisphosphate aldolase	65,1	nd	40,1	nd
77	Anionic peroxidase	219,4	43,5	74,2	42,7

Marcações em vermelho ou azul correspondem respectivamente a proteínas que foram subexpressas ou superexpressas, e o percentual com que elas foram alteradas encontra-se no interior de cada célula. nd: não diferencial; C: ausência de NaCl a NPS; S: presença de NaCl e ausência de NPS; C-NPS: ausência de NaCl e presença de NPS; S-NPS: presença de NaCl e NPS.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados do primeiro experimento mostraram que a atenuação dos efeitos da salinidade nas plantas de milho (variedade BR 5011) foi dependente da concentração de NPS, sendo 75  $\mu\text{M}$  a concentração mais adequada, entre as testadas.

A menor redução do crescimento das plantas aos 7 dias de estresse salino, devido ao pré-tratamento com NPS a 75  $\mu\text{M}$ , esteve mais relacionada com uma melhor homeostase iônica do que com o aumento da eficiência do sistema antioxidativo.

O pré-tratamento das plantas de milho com NPS a 75  $\mu\text{M}$  foi parcialmente eficaz na atenuação dos efeitos da salinidade, pois os efeitos de melhora que ele causou às plantas após 7 dias de estresse não perduraram aos 14 dias de estresse.

A análise proteômica permitiu identificar proteínas diferencialmente expressas

## 6 REFERÊNCIAS

- ABOGADALLAH, G.M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signaling and Behavior**, v. 5, p. 369-374, 2010.
- AHMAD, P.; JALEEL, C.A.; SALEM, M.A.; NABI, G.; SHARMA, S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 161-175, 2010.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARAGÃO, R.M.; SILVEIRA, J.A.G.; SILVA, E.N.; LOBO, A.K.M.; DUTRA, A.T.B. Absorção, fluxo no xilema e assimilação do nitrato em feijão-caupi submetido à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, p. 100-106, 2010.
- ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, v. 172, p. 876-887, 2007.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 235-241, 1992.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 50, p. 187-204, 1999.
- ASHRAF, M.; ATHAR, H.R.; HARRIS, P.J.C.; KWON, T.R. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. **Advances in Agronomy**, v. 97, p. 45-110, 2008.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Pre-sowing seed treatment — a shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. **Advances in Agronomy**, v. 88, p. 223-271, 2005.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Photosynthesis under stressful environments. **Photosynthetica**, v. 51, p. 163-190, 2013.
- ASTIER, J.; LINDERMAYR, C. Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 15193-15208, 2012.

- ASTOLFI, S.; ZUCHI, S. Adequate S supply protects barley plants from adverse effects of salinity stress by increasing thiol contents. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 175-181, 2013.
- AZEVEDO NETO, A.D.; GOMES FILHO, E.; PRISCO, J.T. Salinity and oxidative stress. In: KHAN, N. A.; SINGH, S. (Org.). **Abiotic stress and plant responses**. Aligarh: IK International Group, 2008, p. 58-82.
- AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C. E. B.; GOMES-FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 87-94, 2006.
- AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; MEDEIROS, J.-V.R.; GOMES-FILHO, E. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 1114-1122, 2005.
- AZEVEDO NETO, A.D.; TABOSA, J.N. Estresse salino em plântulas de milho: parte I análise do crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, p. 159-164, 2000.
- BAETHGEN, W.E.; ALLEY, M.M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, p. 961-969, 1989.
- BARHOUMI, Z.; ATIA, A.; RABHI, M.; DJEBALL, W.; ABDELLY, C.; SMAOUI, A. Nitrogen and NaCl salinity effects on the growth and nutrient acquisition of the grasses *Aeluropus littoralis*, *Catapodium rigidum*, and *Brachypodium distachyum*. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 173, p. 149-157, 2010.
- BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, p. 1046-1054, 2005.
- BEAUCHAMP, C.; FRICOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.
- BECANA, M.; MATAMOROS, M.A.; UDVARDI, M.; DALTON, D.A. Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. **New Phytologist**, v. 188, p. 960-976, 2010.
- BESSON-BARD, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. New insights into nitric oxide signalling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 21-39, 2008.
- BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; JONES, R.L. Nitric oxide in seed dormancy and germination. In: BRADFORD, K.; NONOGAKI, H. **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p. 153-175.

- BONIFACIO, A.; MARTINS, M.O.; RIBEIRO, C.W.; FONTENELE, A.V.; CARVALHO, F.E.L.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J.A.G. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 1705-1722, 2011.
- BOTELLA M.; ROSADO, A.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Plant adaptive responses to salinity stress. In: JENKS, M.A.; HASEGAWA, P.M. (ed.). **Plant abiotic stress**. New York: Blackwell Publishing, p. 37-70, 2005.
- BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica do fósforo com extrato de solos e plantas. **Revista Ceres**, v. 41, p. 73-85, 1974.
- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, E. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1158-1203.
- BUI, E.N. Soil salinity: A neglected factor in plant ecology and biogeography. **Journal of Arid Environments**, v. 92, p. 14-25, 2013.
- CATALDO, D.A.; HAROONH, M.; SHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551-560, 2009.
- CHEESEMAN, J.M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2435-2444, 2006.
- CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J-K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v. 45, p. 437-448, 2005.
- COMINELLI, E.; CONTI, L.; TONELLI, C.; GALBIATI, M. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. **New Biotechnology**, v. 30, p. 355-361, 2013.
- CONDE, A; CHAVES, M.M.; GERÓS, H. Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, p. 1583-1602, 2011.
- CORDEIRO, G.G. **Salinidade em agricultura irrigada: conceitos básicos e práticos**. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido, 2001. 38p. (EMBRAPA, Documentos, n.º 180.).

- CORPAS, F.J.; LETERRIER, M.; VALDERRAMA, R.; AIRAKI, M.; CHAKI, M.; PALMA, J.M.; BARROSO, J.B. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. **Plant Science**, v. 181, p. 604-611, 2011.
- COSTA, P.H.A.; AZEVEDO NETO, A.D.; BEZERRA, M.A.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 353-361, 2005.
- CRAMER, G. R.; ALBERICO, G. J.; SCHMIDT, C. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 21, p. 675-692, 1994.
- CRAWFORD, N. M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 471-478, 2006.
- CHRISTOU, A.; MANGANARIS, G. A.; FOTOPOULOS, V. Systemic mitigation of salt stress by hydrogen peroxide and sodium nitroprusside in strawberry plants via transcriptional regulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 107, p. 46-54, 2014.
- CUI, X.M.; ZHANG, Y.K.; WU, X.B.; LIU, C.S. The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. **Plant, Soil and Environment**, v. 6, p. 274-281, 2010.
- DAKER, A. **A água na agricultura: irrigação e drenagem**. 7. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1988. 543p.
- del RÍO, L.A.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 330-335, 2006.
- DIETZ, K.-J. Plant peroxiredoxins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 93-107, 2003.
- DIXON, D.P.; DAVIS, B.G.; EDWARDS, R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 30859-30869, 2002.
- DONG, Y.; XU, L.; WANG, Q.; FAN, Z.; KONG, J.; BAI, X. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element contents of perennial ryegrass under copper stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, p. 402-411, 2014.
- DUARTE, J.O. Introdução e importância econômica do milho. In: CRUZ, J.C.; VERSIANI, R.P.; FERREIRA, M.T.R. (ed.) **Cultivo do milho**. 2000. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>>. Acesso em: 02 nov. 2010.

- DUMAN, F. Uptake of mineral elements during abiotic stress. In: AHMAD, P.; PRASAD, M. N. V. (eds.). **Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability**. Berlin: Springer Science + Business Media, p. 267-281, 2012.
- EGBICHI, I.; KEYSTER, M.; LUDIDI, N. Effect of exogenous application of nitric oxide on salt stress responses of soybean. **South African Journal of Botany**, v. 90, p. 131-136, 2014.
- ELSTNER, E.F.; HEUPEL, A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. **Analytical Biochemistry**, v. 70, p. 616-620, 1976.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils**. 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2006.
- FEIJÃO, A. R.; MARQUES, E. C.; SILVA, J. C. B.; LACERDA, C. F.; PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Nitrato modula os teores de cloreto e compostos nitrogenados em plantas de milho submetidas à salinidade. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p.10-19, 2013.
- FILIPPOU, P.; TANOU, G.; MOLASSIOTIS, A.; FOTOPOULOS, V. Plant acclimation to environmental stress using priming agents. In: TUTEJA, N.; GILL, S.S. (Ed.). **Plant acclimation to environmental stress**. New York: Springer Science + Business Media, 2013, p. 1-27.
- FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 247-245, 2003.
- FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; MILCZAREK, G.; ARASIMOWICZ, M.; CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, v. 224, p. 1363-1372, 2006.
- FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 307-319, 2004.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, v. 146, p. 359-388, 2000.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364, 2003.

- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Physiology**, v. 28, p. 1056-1071, 2005.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, p. 861-905, 2009.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiology**, v. 155, p. 2-18, 2011.
- GAINES, T.P.; PARKER, M.B.; GASCHO, G.J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate extraction. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 371-374, 1984.
- GALLIE, D.R. The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. **Journal of Experimental Botany**, v.64, p. 433-443, 2013.
- GAO, C.; ZHANG, K.; YANG, G.; WANG, Y. Expression analysis of four peroxiredoxin genes from *Tamarix hispida* in response to different abiotic stresses and exogenous abscisic acid (ABA). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3751-3764, 2012.
- GARCÍA-MATA, C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1196-1204, 2001.
- GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J.M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p. 149-155, 1999.
- GEILFUS, C. M.; ZÖRB,C.; MÜHLING, K. H. Salt stress differentially affects growth-mediating  $\beta$ -expansins in resistant and sensitive maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 993-998, 2010.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GONDIM, F.A.; GOMES FILHO, E.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T.; AZEVEDO NETO, A.D.; MARQUES, E.C. Pretreatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 103-112, 2010.
- GONDIM, F.A.; GOMES-FILHO, E.; COSTA, J.H.; ALENCAR, N.L.M.; PRISCO, J.T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 62-71, 2012.

- GRATTAN, S. R.; GRIEVE, C. M. Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 38, p. 275-300, 1992.
- GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.
- GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, p. 207-212, 1980.
- GUO, Y.; TIAN, Z.; YAN, D.; ZHANG, J.; QIN, P. Effects of nitric oxide on salt stress tolerance in *Kosteletzkya virginica*. **Life Science Journal**, v. 6, p. 67-75, 2009.
- GUNES, A.; INAL, A.; ALPASLAN, M.; ERASLAN, F.; BAGCI, E.G.; CICEK, N. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 728-736, 2007.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press. 1989. 543 p.
- HASEGAWA, P. M. Sodium (Na<sup>+</sup>) homeostasis and salt tolerance of plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 92, p. 19-31, 2013.
- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.-K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 385-395, 1968.
- HERNÁNDEZ, J.A.; FERRER, M.A.; JIMENEZ, A.; ROS BARCELÓ, A.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, v. 127, p. 817-831, 2001.
- HICHEM, H.; MOUNIR, D.; NACEUR, A. Differential responses of two maize varieties to salt stress: changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 144-151, 2009.

- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-cultured method for growing plants without soil**. California: California Agricultural Experiment Station, Circular n° 37, 1950. 32 p.
- HORVÁTH, E.; SZALAI, G.; PÁL, M.; PÁLDI, E.; JANDA, T. Differences between the catalase isozymes of maize (*Zea mays* L.) in respect of inhibition by various phenolic compounds. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, p. 33-34, 2002.
- HU, K.-D.; HU, L.-Y.; LI, Y.-H.; ZHANG, F.-Q.; ZHANG, H. Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. **Plant Growth Regulation**, v. 53, p. 173-183, 2007.
- HU, Y.; SCHMIDHALTER, U. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, p. 541-549, 2005.
- JACOBSEN, T.; ADAMS, R.M. Salt and silt in ancient Mesopotamian agriculture. **Science**, v. 128, p. 1251-1258, 1958.
- JALLEL, C.A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANAVANNAN, P.; INÈS, J.; AL-JUBURI, H.J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 427-436, 2009.
- KOPYRA, M.; GWÓZDŹ, E.A; Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 1011-1017, 2003.
- KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I.T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1301-1322, 2011.
- KRIEGER-LISZKAY, A. Singlet oxygen production in photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 337-346, 2005.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531p.
- LAW, M.Y.; CHARLES, S.A.; HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of peroxide hydrogen and paraquat. **Biochemical Journal**, v. 210, p. 899-903, 1983.
- LEE, S.-H.; AHSAN, N.; LEE, K.-W.; KIM, D.-H.; LEE, D.-G.; KWAK, S.-S.; KWON, S.-Y.; KIM, T.-H.; LEE, B.-H. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased

- tolerance to a wide range of abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1626-1638, 2007.
- LI, Q.-Y.; NIU, H.-B.; YIN, J.; WANG, M.-B.; SHAO, H.-B.; DENG, D.-Z.; CHEN, X.-X.; REN, J.-P.; LI, Y.-C. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, p. 220-225, 2008.
- LI, B.; McKEAND, S.E.; ALLEN, H.L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, v. 37, p. 613-626, 1991.
- LIU, S.; DONG, Y.J.; XU, L.L.; KONG, J.; BAI, X.Y. Roles of exogenous nitric oxide in regulating ionic equilibrium and moderating oxidative stress in cotton seedlings during salt stress. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, p. 929-941, 2013.
- MAATHUIS, F.J.M. Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. **Journal of Experimental Botany**, 2013. No prelo.
- MAATHUIS, F.J.M.; DIATLOFF, E. Roles and functions of plant mineral nutrients. In: MAATHUIS, F. J. M. (ed.). Plant mineral nutrients: methods and protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 953, p. 1-21, 2013.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p.139-158, 2005.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba, SP: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1989.
- MANSOUR, M.M.F. Plasma membrane permeability as an indicator of salt tolerance in plants. **Biologia Plantarum**, v. 57, p. 1-10, 2013.
- MANSOUR, M.M.F.; SALAMA, K.H.A. Cellular basis of salinity tolerance in plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 113-122, 2004.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. London: Academic Press, 1995. 889 p.
- MASS, E.V.; HOFFMAN, G.J. Crop salt tolerance-current assessment. **Journal of the Irrigation and Drainage Division**, v. 103, p. 115-134, 1977.
- MELONI, D.A.; OLIVA, M.A.; MARTINEZ, C.A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.49, p. 69-76, 2003.

- MENEGUZZO, S.; NAVARI-IZZO, F.; IZZO, R. NaCl effects on water relations and accumulation of mineral nutrients in shoots, roots and cell sap of wheat seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 156, p. 711-716, 2000.
- MILLAR, A.H.; MITTOVA, V.; KIDDLE, G.; HEAZLEWOOD, J.L.; BARTOLI, C.G.; THEODOULOU, F.L.; FOYER, C.H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. **Plant Physiology**, v. 133, p. 443-447, 2003.
- MILLER, A.J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v. 274, p. 1-36, 2004.
- MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 481-489, 2008.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in plant science**, v. 9, p. 490-498, 2004.
- MITTOVA, V.; GUY, M.; TAL, M.; VOLOKITA, M. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1105-1113, 2004.
- MITTOVA, V.; TAL, M.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 393-400, 2002.
- MITTOVA, V.; TAL, M.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 845-856, 2003.
- MØLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561-591, 2001.
- MØLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-491, 2007.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance. **New Phytologist**, v. 167, p. 645-663, 2005.

- MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole-plant responses to salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 143-160, 1986.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651–681, 2008.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.
- NAWAZ, K.; ASHRAF, M. Exogenous application of glycinebetaine modulates activities of antioxidants in maize plants subjected to salt stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 196, p. 28-37, 2010.
- NEILL, S.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D.; WILSON, I. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 165-176, 2008.
- NIU, X.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; PARDO, J.M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, v. 109, p. 735-742, 1995.
- NOCTOR, G. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 409-425, 2006.
- NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279, 1998.
- NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1283-1304, 2002.
- OMOTO, E.; TANIGUCHI, M.; MIYAKI, H. Adaptation responses in C<sub>4</sub> photosynthesis of maize under salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 469-477, 2012.
- ÖZTETİK, E. A tale of plant glutathione S-transferases: since 1970. **Botanical Review**, v. 74, p. 419-437, 2008.
- PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos dos grãos do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Circular Técnica n.º 75).
- PALMGREN, M.G.; HARPER, J.F. Pumping with plant P-type ATPases. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 883–893, 1999.
- PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

- PARIDA, A.K.; DAS, A.B.; MOHANTY, P. Defense potentials to NaCl in mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 531-542, 2004.
- PERL-TREVES, R.; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. In: INZÉ, D.; van MONTAGU, M. (eds). **Oxidative stress in plants**. London: Taylor and Francis, p.1-32, 2002.
- PINGBO, C.; XIA, L.; KAI, H.; XIAODONG, W.; CHUANCHAO, D.; CHUANGEN, L. Promotion of photosynthesis in transgenic rice over-expressing of maize C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene by nitric oxide donors. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 458-466, 2014.
- PLAUT, Z.; EDELSTEIN, M.; BEN-HUR, M. Overcoming salinity barriers to crop production using traditional methods. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, p. 250-291, 2013.
- PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. (Org.). **Manejo da salinidade na agricultura irrigada**: estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 143-160.
- QIAO, W.; FAN, L.-F. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 1238-1246, 2008.
- QUAN, L.-J.; ZHANG, B.; SHI, W.-W.; LI, H.-Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 2-18, 2008.
- RAZA, S. H.; ATHAR, H.R.; ASHRAF, M.; HAMEED, A. Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 368-376, 2007.
- RENGASAMY, P. World salinization with emphasis on Australia. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1017-1023, 2006.
- REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 357-363, 1994.
- RICHARDS, L.A. (Ed.). **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington: US Department of Agriculture, Handbook n.º 60, 1954. 160p.
- ROZEMA, J.; FLOWERS, T. Crops for a salinized world. **Science**, v. 322, p. 1478-1480, 2008.

- SAKIHAMA, Y.; MURAKAMI, S.; YAMASAKI, H. Involvement of nitric oxide in the mechanism for stomatal opening in *Vicia faba* leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 117-119, 2003.
- SARMA, A.D.; OERLE, N.W.; EMERICH, D.W. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 379, p. 192-195, 2008.
- SHALATA, A.; MITTOVA, V.; VOLOKITA, M.; GUY, M.; TAL, M. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 487-494, 2001.
- SHANNON, M.C.; GRIEVE, C.M. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 5-38, 1999.
- SHI, Q.; DING, F.; WANG, X.; WEI, M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 542-550, 2007.
- SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, Y. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305-1319, 2002.
- SIDDIQUI, M.H.; AL-WHAIBI, M.H.; BASALAH, M.O. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. **Protoplasma**, v. 248, p. 447-455, 2011.
- SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.V.; ARORA, K. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, v. 53, p. 65-73, 2007.
- SMIRNOFF, N. Vitamin C: The metabolism and functions of ascorbic acid in plants. **Advances in Botanical Research**, v. 59, p. 107-177, 2011.
- SUNG, C.H.; HONG, J.H. Sodium nitroprusside mediates seedling development and attenuation of oxidative stress in Chinese cabbage. **Plant Biotechnology Reports**, v. 4, p. 243-251, 2010.
- SWIADER, J.M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F.G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal of Plant Nutrition**, v. 17, p. 1687-1699, 1994.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.
- TEAKLE, N. L.; TYERMAN, S. D. Mechanisms of Cl<sup>-</sup> transport contributing to salt tolerance. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 566-589, 2010.

- TRIPATHI, B.N.; BHATT, I.; DIETZ, K.-J. Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. **Protoplasma**, v. 235, p. 3-15, 2009.
- TUNA, A. L.; KAYA, C. K.; ASHRAF, M.; ALTUNLU, H.; YOKAS, I.; YAGMUR, B. The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 173-178, 2007.
- TÜRKAN, I.; DEMIRAL, T. Recent developments in understanding salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 2-9, 2009.
- TUTEJA, N.; SINGH, L.P.; GILL, S.S.; GILL, R.; TUTEJA, R. Salinity stress: a major constraint in crop production. In: TUTEJA, N.; GILL, S.S.; TIBURCIO, A.F.; TUTEJA, R. **Improving crop resistance to abiotic stress**. Boschstr: Wiley-Blackwell, 2012. p. 71-96.
- UCHIDA, A.; JAGENDORF, A.T.; HIBINO, T.; TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, v. 163, p. 515-523, 2002.
- VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARTY, R.; THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) — differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v. 165, p. 1411-1418, 2003.
- WAHID, A.; PERVEEN, M.; GELANI, S.; BASRA, S.M.A. Pretreatment of seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 283-294, 2007.
- WAKEEL, A. Potassium-sodium interactions in soil and plant under saline-sodic conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, p. 344-354, 2013.
- WANG, P.; SONG, C. P. Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. **New Phytologist**, v. 178, p. 703-718, 2008.
- WANG, Q.; LIANG, X.; DONG, Y.; XU, L.; ZHANG, X.; HOU, J.; FAN, Z. Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity, element contents and antioxidative system in perennial ryegrass. **Plant Growth Regulation**, v. 69, p. 11-20, 2013.
- WANG, W.; VINO CUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

- WANG, X. Y.; SHEN, W. B.; XU, L. L. Exogenous nitric oxide alleviates osmotic stress-induced membrane lipid peroxidation in wheat seedling leaves. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 30, p. 195-200, 2004.
- WU, X.X.; DING, D.H.; CHEN, J.L.; ZHANG, H.J.; ZHU, W.M. Attenuation of salt-induced changes in photosynthesis by exogenous nitric oxide in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 7837-7846, 2010.
- XIONG, L; ZHU, J-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p. 131-139, 2002.
- XU, J.; DUAN, X.; YANG, J.; BEECHING, J.R.; ZHANG, P. Coupled expression of Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in cassava improves tolerance against cold and drought stresses. **Plant Signaling and Behavior**, v. 8, e24525, 2013.
- XU, Y.; SUN, X.; JIN, J; ZHOU, H. Protective effect of nitric oxide on light-induced oxidative damage in leaves of tall fescue. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 512-518, 2010.
- YADAV, S.; IRFAN, M.; AHMAD, A.; HAYAT, S. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, p. 667-685, 2011.
- YOSHIMURA, K.; MIYAO, K.; GABER, A.; TAKEDA, T.; KANABOSHI, H.; MIYASAKA, H.; SHIGEOKA, S. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. **The Plant Journal**, v. 37, p. 21-33, 2004.
- YOUSUF, P.Y.; HAKEEM, K.U.R.; CHANDNA, R.; AHMAD, P. Role of glutathione reductase in plant abiotic stress. In: AHMAD, P.; PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability**. New York: Springer Science + Business Media, 2012, p. 149-158.
- YU, S.; WANG, W.; WANG, B. Recent progress of salinity tolerance research in plants. **Russian Journal of Genetics**, v. 48, p. 497-505, 2012.
- ZHANG, Y.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, G.; WEI, Q.; ZHANG, W. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in the tonoplast. **Planta**, v. 224, p. 545-555, 2006.
- ZHANG, F.; WANG, Y.; YANG, Y.; WU, H.; WANG, D.; LIU, J. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica*. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 775-785, 2007.
- ZHU, J-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 66-71, 2001.

ZHU, J-K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 441-445, 2003.