

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
DOUTORADO EM BIOQUÍMICA

JOSEMIR MOURA MAIA

**RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INDUZIDA POR ESTRESSE SALINO COMO
UMA ESTRATÉGIA DE DEFESA OXIDATIVA EM RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPI**

FORTALEZA – CEARÁ
2008

JOSEMIR MOURA MAIA

**RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INDUZIDA POR ESTRESSE SALINO COMO
UMA ESTRATÉGIA DE DEFESA OXIDATIVA EM RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPI**

*Tese submetida à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará, como
parte dos requisitos para a obtenção do
grau de Doutor em Bioquímica.*

Área de concentração: Bioquímica

*Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio
Gomes da Silveira*

FORTALEZA – CEARÁ

2008

M186r Maia, Josemir Moura

Restrição de crescimento induzida por estresse salino como
uma estratégia de defesa oxidativa em raízes de feijão-caupi
[manuscrito] / Josemir Moura Maia

163 f. : il. color. ; enc.

Orientador: Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

Área de concentração: Bioquímica

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza, 2008

1. Proteção oxidativa 2. Vigna unguiculata – Estresse salino
3. Enzimas antioxidantes 4. Plantas – Efeito do sal I. Silveira,
Joaquim Albenísio Gomes da (orient.) II. Universidade Federal
do Ceará – Doutorado em Bioquímica III. Título

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A transcrição de qualquer trecho dessa Dissertação será permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da Ética Científica.

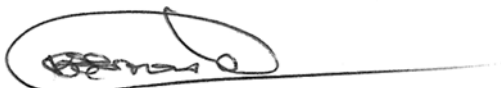
Tese aprovada em 29 de maio de 2008.



Josemir Moura Maia
Biólogo




Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira
UFC/DBBM – Orientador



Benildo Sousa Cavada
UFC/DBBM – Conselheiro



José Tadeu Abreu de Oliveira
UFC/DBBM - Conselheiro



Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo
UFRN/DBCG – Conselheira



Victor Alexandre Vitorello
USP/CENA - Conselheiro

Dedico esta tese ao meu orientador.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos que tem derramado sobre mim.

*Ao Prof. Dr. **Joaquim Albenísio Gomes da Silveira**, pela valiosa orientação, pelas cobranças, pelo incentivo; e pela confiança na realização deste trabalho.*

*Ao professor **Benildo Sousa Cavada** pela disponibilidade e interesse em colaborar com a execução e participar da avaliação deste trabalho.*

*Ao professor **José Tadeu Abreu de Oliveira** pelas parcerias informais, dúvidas esclarecidas e disponibilidade de reagentes e equipamentos imprescindíveis para a execução dos experimentos. Agradeço também pela disponibilidade e interesse em participar da avaliação deste trabalho.*

*À professora **Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo** pela valorosa parceria, incentivo, amizade desde a defesa da dissertação de mestrado. Agradeço também pela disponibilidade e interesse em participar da avaliação desta tese e pelas imprescindíveis contribuições intelectuais.*

*Ao professor **Victor Alexandre Vitorello** pela disponibilidade e interesse em participar da avaliação deste trabalho.*

*Aos professores, **Arlete Aparecida Soares, Cristina Paiva da Silveira Carvalho, Dirce Fernandes de Melo, Francisco de Assis de Paiva Campos, Ilka Maria Vasconcelos e Maria Raquel Alcântara de Miranda** pela colaboração direta com conselhos, orientação em ensaios e experimentos, esclarecimento de protocolos, doação de reagentes, auxílio e empréstimo de equipamentos indispensáveis para a realização desta tese.*

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que contribuíram para o meu aprendizado durante a minha permanência no curso.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pelo apoio e atenção durante a realização desta tese.

Aos funcionários, sempre competentes, prestativos e companheiros.

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela participação direta no financiamento desta desse trabalho.*

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio indireto no financiamento e suporte ao desenvolvimento deste trabalho

*Ao amigo **João Batista Santiago Freitas** do Departamento de Fitotecnia pelo incentivo, longa parceria profissional e pela doação das sementes utilizadas nos experimentos.*

*Aos amigos **Eduardo Luiz Voigt, João Paulo Matos Santos Lima, Luiz Aguiar Ferreira Ponte, Sérgio Luiz Ferreira da Silva, Theresa Christine Filgueiras Russo Aragão** em especial pela longa parceria profissional e pelos momentos fraternos ao longo dos quatro anos de doutorado.*

*Aos amigos, **Adilton de Vasconcelos Fontenele, Alana Cecília de Menezes Sobreira, Cícera Raquel Fernandes Rodrigues, Cristina Silva de Lima, Darcy Mayra Furtado Gondim, Fábio Rossi Cavalcanti, José Hélio Costa, José Hélio de Araújo Filho, Marcelo Brito Cavalcante, Tales Rocha de Moura e Wanessa Kaline de Araújo Moura Correia** pela colaboração direta com a execução, esclarecimentos de protocolos, operação de equipamentos e outras atividades importantes para a finalização do trabalho.*

*Ao meu Irmão (**Fábio**) e minha mãe (**Neide**) e minha avó (**Luiza**) pelo incentivo, paciência e companheirismo em todos os momentos de minha vida.*

*À **Silvana** por tudo que tivemos que passar e por sua paciência comigo durante todos esses anos ao meu lado.*

A todos enfim, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
- Universidade Federal do Ceará - UFC
- Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa - FUNCAP

"A vida é como jogar uma bola na parede: se jogar uma bola azul, ela voltará azul; se jogar uma bola verde, ela voltará verde; se jogar a bola fraca, ela voltará fraca; se jogar a bola com força, ela voltará com força. Por isso, nunca "jogue uma bola na vida" de forma que você não esteja pronto a recebê-la. A vida não dá, nem empresta; não se comove, nem se apieda. Tudo quanto ela faz é retribuir e transferir aquilo que nós lhe oferecemos".

Albert Einstein, In: Out of My Later Years, 1950

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xviii
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxv

CAPÍTULO 1

SALINIDADE INDUZ MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE DO CRESCIMENTO DE RAÍZES	26
1.1. INTRODUÇÃO	27
1.2. OS COMPONENTES DA SALINIDADE COMO INDUTORES DE RESPOSTA E ESTRESSE OXIDATIVO	28
1.3. PERCEPÇÃO E SINALIZAÇÃO NA RESPOSTA AO ESTRESSE IÔNICO, OSMÓTICO E OXIDATIVO	31
1.3.1. Estresse iônico	31
1.3.2. Estresse osmótico	33
a) Ácido abscísico (ABA)	35
b) Cálcio (Ca^{+2})	36
c) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	36
1.4. AS PRINCIPAIS FONTES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM RAÍZES	38
1.4.1. Apoplasto	40
1.4.2. Mitocôndrias e peroxissomas	41
1.5. OS SISTEMAS DE ELIMINAÇÃO DE EROS E MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE REDOX	43
1.5.1. Antioxidantes não-enzimáticos	43
1.5.2. Antioxidantes enzimáticos	45

1.6. CRESCIMENTO DE RAÍZES E ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS	49
1.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
INTERCAPÍTULO 1	61
HIPÓTESE	62
OBJETIVOS	62
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
 <i>CAPÍTULO 2</i>	
RESPOSTA OXIDATIVA INDUZIDA POR NaCl EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI	63
2.1. INTRODUÇÃO	64
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	66
2.2.1. Material vegetal, condições de cultivo	66
2.2.2. Tratamento e coleta das plântulas	66
2.2.3. Comprimento radicular, massa seca, conteúdo relativo de água e relação K^+/Na^+	67
2.2.4. Danos de membranas e peroxidação de lipídeos	67
2.2.5. Atividade de dismutase de superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX) e peroxidase de fenóis (POX)	68
2.3. RESULTADOS	70
2.4. DISCUSSÃO	75
2.5. CONCLUSÕES	78
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
INTERCAPÍTULO 2	83

CAPÍTULO 3

RESPOSTAS NO CRESCIMENTO E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI EM RELAÇÃO À INTENSIDADE DO TRATAMENTO SALINO	84
3.1. INTRODUÇÃO	85
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	87
3.2.1. Material vegetal, condições de cultivo	87
3.2.2. Tratamento e coleta das plântulas	87
3.2.3. Comprimento radicular, conteúdo relativo de água, teor de Na ⁺	88
3.2.4. Danos de membranas e peroxidação de lipídeos	88
3.2.5. Atividade de dismutase de superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX) e peroxidase de fenóis (POX)	88
3.2.6. Desenho experimental e análise estatística	88
3.3. RESULTADOS	89
3.4. DISCUSSÃO	93
3.5. CONCLUSÕES	96
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
INTERCAPÍTULO 3	100

CAPÍTULO 4

RESPOSTAS NO CRESCIMENTO E ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPI EM RELAÇÃO AO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO NaCl	101
4.1. INTRODUÇÃO	102
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	104
4.2.1. Material vegetal, condições de cultivo	104
4.2.2. Tratamento e coleta das plântulas	104

4.2.3. Comprimento radicular, conteúdo relativo de água, teor de Na ⁺	105
4.2.4. Danos de membranas e peroxidação de lipídeos	105
4.2.5. Atividade de dismutase de superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX) e peroxidase de fenóis (POX)	105
4.2.6. Desenho experimental e análise estatística	105
4.3. RESULTADOS	106
4.4. DISCUSSÃO	110
4.5. CONCLUSÕES	114
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
INTERCAPÍTULO 4	119

CAPÍTULO 5

METABOLISMO OXIDATIVO EM APOPLASTO E REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO DE RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPI EXPOSTO AO ESTRESSE SALINO	120
5.1. INTRODUÇÃO	121
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	123
5.2.1. Material vegetal, condições de cultivo	123
5.2.2. Experimento I	123
5.2.3. Experimento II	124
5.2.4. Experimento III	124
5.2.5. Histoquímica de danos de membranas e peroxidação de lipídeos	125
5.2.6. Determinação do comprimento radicular e lignina	125
5.2.7. Extratos totais, extrato protéico de parede celular e extração de fluido apoplástico	126
5.2.8. Isolamento de frações enriquecidas de membrana plasmática	128
5.2.9. Determinação da concentração de ascorbato e fenóis	128

5.2.10. Determinação de H ₂ O ₂ e peroxidação de lipídeos	129
5.2.11. Ensaio enzimáticos	129
5.3. RESULTADOS	131
5.3.1. Aspectos morfológicos de raízes e avaliação de séries temporais da concentração de H ₂ O ₂ e peroxidação de lipídeos	131
5.3.2. Atividade da via de produção/remoção de H ₂ O ₂ apoplástica de raízes	134
5.3.3. Relação apoplasto x extrato total: regulação metabólica das vias de produção/remoção de H ₂ O ₂	137
5.4. DISCUSSÃO	143
5.5. CONCLUSÕES	147
5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

CONSIDERAÇÕES FINAIS

.....	152
-------	-----

ANEXOS

.....	155
-------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

%DM	percentual de danos de membranas
[Trx-(S-S)]	tiorredoxina oxidada
$^1\text{O}_2$	oxigênio singleto
ABA	ácido abscísico
ADP	adenosina difosfato
ANOVA	análise de variância
ANP1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase de <i>Arabidopsis</i>
AO	oxidase de ascorbato
Apo.	apoplasto
APX	(EC 1.11.1.1) - peroxidase de ascorbato
AQP	aquaporinas
AsA	ácido ascórbico
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
C-24	tratamento controle durante 48 horas
C-48	tratamento controle durante 48 horas
Ca^{+2}	íon cálcio
CaCl_2	cloreto de cálcio
CaM	calmodulina
CAT	(EC 1.11.1.6) – catalase
CC	canal de cálcio
Cit.	citosol
Cl^-	íon cloreto
CO_2	dióxido de carbono
CPK	calcium protein kinase
CRA	conteúdo relativo de água
CTE	cadeia transportadora de elétrons
Cu/Zn	cobre/zinco
cv.	cultivar
DAS	dias após semeio

DHA	desidroascorbato
DHAR	redutase de desidroascorbato
DPI	cloreto de difenileno iodonium
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilenodiaminotetracético
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FeCl ₃	cloreto férrico
FeSO ₄	sulfato de ferro
G ₁	growth 1 (ciclo celular)
GPX	peroxidase de glutathione
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
GTP	guanosina trifosfato
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
HCl	ácido clorídrico
HK	histidine kinase
HKT	high-affinity potassium transporter
HO•	radical hidroxil
HOO•	radical peroxil
K ⁺	íon potássio
K ₂ S ₂ O ₅	bissulfito de potássio
KCl	cloreto de potássio
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDA	monodesidroascorbato
MDAR	redutase de monodesidroascorbato
MDA-TBA	complexo malonilaldeído-tiobarbiturato
MF	massa fresca

MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
Mit.	mitocôndria
Mn	manganês
MOPS	ácido morfolinopropano sulfônico
MP	membrana plasmática
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
MS	massa seca
MT	massa túrgida
Na ⁺	íon sódio
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaOH	hidróxido de sódio
NBT	azul de nitrotetrazólio cloreto
NHX	antiportador sódio/próton
NOX	(EC 1.6.3.1) oxidase de NADPH
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
Os	<i>Oryza sativa</i>
OXI1	oxidative signal-inducible 1
PC	parede celular
PCD	programmed cell death
PEG	polietilenoglicol
PEP	fosfoenolpiruvato
Per.	peroxissomos
pH	potencial de hidrogênio
PhGPX	peroxidase de hidroperóxidos de lipídeos
PK	(EC 2.7.1.40) – piruvato quinase
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfônico

POX	(EC 1.11.1.7) – peroxidase de fenóis
Rec.	tratamento de recuperação
RWC	relative water content
S	síntese (ciclo celular)
S-24	tratamento NaCl 100 mM durante 24 horas
S-48	tratamento NaCl 100 mM durante 48 horas
SOD	(EC 1.15.1.1) – dismutase de superóxido
SOS	salt overly sensitive
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
UA	unidade de atividade
V-ATPase	ATPase inibida por vanadato
X	fenol aleatório
X [•]	radical fenol aleatório

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 01 – Produção de espécies reativas de oxigênio em raízes. Siglas: Apo - apoplasto; Cit – citosol; CTE – cadeia transportadora de elétrons; PC – parede celular; EROs – espécies reativas de oxigênio, HO• – radical hidroxil, HOO• – radical peroxil; Mit - mitocôndrias; Per – peroxissoma; MP - membrana plasmática; SOD – dismutase de superóxido **39**

Tabela 2 – Mecanismos de eliminação de espécies reativas de oxigênio em raízes, seus compartimentos celulares e respectivas espécies removidas **46**

CAPÍTULO 5

Tabela 1 – Percentual de atividade de piruvato quinase (PK) em fração apoplástica e de parede celular **137**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Componentes do estresse salino. O tratamento salino pode causar estresse iônico, osmótico e oxidativo. O estresse iônico é causado pelo aumento da concentração de Na^+ no citosol, principalmente pela competição com o K^+ por canais de transporte, como o HKT1. No citosol, o Na^+ , em concentrações superiores aos do K^+ , provoca desbalanceamento de cargas, inibição de diversas reações enzimáticas dependentes de K^+ e interfere na pressão de turgor. O estresse osmótico é causado por mudanças 29

Figura 2 – Durante o estresse salino o Na^+ pode competir com o K^+ por canais de transporte. O Na^+ estimula a atividade antiporte da proteína SOS1 transmembrar tanto pela porção apoplástica (Apo.), quanto pelo lado citosólico (Cit.). Diferenças no potencial elétrico transmembrar provocados pelo Na^+ estimulam a entrada de Ca^{+2} , principalmente por uma proteína canal de cálcio (CC). O cálcio citoplasmático ativa a cascata SOS além de induzir a atividade de oxidase de NADPH (NOX). A proteína SOS2 32

Figura 3 – Um possível mecanismo de percepção do estresse osmótico, causado por salinidade e seca, envolve uma proteína HK1. A sinalização do estresse osmótico envolve diversas quinases dependentes de Ca^{+2} (CPKs). Estas proteínas participam de cascatas de sinalização que induzem a síntese de transcritos específicos, destinados a promoção da resposta fisiológica. O Ca^{+2} citoplasmático (Cit.), também participa do controle da resposta oxidativa e ativa a proteína G. Uma CaM pode ativar a catalase e concomitantemente 34

Figura 4 – Mecanismos de controle de crescimento pela atividade de peroxidases apoplásticas e pelo metabolismo do ascorbato. O $\text{O}_2^{\cdot -}$ produzido no apoplasto é convertido a H_2O_2 por uma SOD apoplástica. Uma peroxidase de fenóis (POX) ligada à parede celular degrada o H_2O_2 formando H_2O e O_2 , utilizando fenóis apoplásticos (X) como substratos redutores. Os radicais de fenóis (X^{\cdot}) são adjuvantes na formação de lignina. Esse polímero enrijece a parede celular, restringindo o crescimento da célula. Por outro lado, as POX 50

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Comprimento radicular (A), conteúdo relativo de água (B), massa seca (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi das cultivares Pérola (à esquerda de cada gráfico) e Pitiúba (à direita de cada gráfico) com 4 dias de idade, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 2 dias. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$). 71

Figura 2 – Conteúdo de Na^+ (A) e razão K^+/Na^+ (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi das cultivares Pérola (à esquerda de cada gráfico) e Pitiúba (à direita de cada gráfico) com 4 dias de idade, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 2 dias. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$). 72

Figura 3 – Danos de membranas (A) e peroxidação de lipídeos (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi das cultivares Pérola (à esquerda de cada gráfico) e Pitiúba (à direita de cada gráfico) com 4 dias de idade, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 2 dias. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$). 73

Figura 4 – Atividade de SOD(A), APX (B), CAT (C) e POX (D) em raízes de plântulas de feijão-caupi das cultivares Pérola (à esquerda de cada gráfico) e Pitiúba (à direita de cada gráfico) com 4 dias de idade, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 2 dias. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$). 74

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Comprimento radicular (A), Concentração de Na^+ (B) e conteúdo relativo de água (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi cv. Pérola e Pitiúba, tratadas com NaCl 0, 25, 50, 75 e 100 mM. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 90

Figura 2 – Vazamento de eletrólitos (A) e peroxidação de lipídeos (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi cv. Pérola e Pitiúba, tratadas com NaCl 0, 25, 50, 75 e 100 mM. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 91

Figura 3 – Atividade de dismutase de superóxido (SOD) (A), peroxidase de ascorbato (APX) (B), catalase (CAT) (C) e peroxidase de fenóis (POX) (D) em raízes de plântulas de feijão-caupi cv. Pérola e Pitiúba, tratadas com NaCl 0, 25, 50, 75 e 100 mM. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 92

CAPÍTULO 4

Figura 1 – Comprimento radicular (A), concentração de Na^+ (B) e conteúdo relativo de água (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cv. Pitiúba, submetidas a doses de 0 mM – controle, 50 e 100 mM de NaCl, durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 107

Figura 2 – Vazamento de eletrólitos (A) e peroxidação de lipídeos (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cv. Pitiúba, submetidas a doses de 0 mM – controle, 50 e 100 mM de NaCl, durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 108

Figura 3 – Atividade enzimática de dismutase de superóxido (SOD) (A), peroxidase de ascorbato (APX) (B), catalase (CAT) (C) e peroxidase de fenóis (POX) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cv. Pitiúba, submetidas doses de 0 mM – controle, 50 e 100 mM de NaCl, durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 109

CAPÍTULO 5

Figura 1 – Aspectos gerais de plântulas feijão-caupi cv. Pitiúba no 6º dia após o semeio e 48 horas de tratamento com 100 mM de NaCl. Morfologia das plântulas de feijão-caupi (A – controle, B – tratadas com 100 mM de NaCl). Danos de membranas *in vivo* em segmentos apicais de raízes de feijão-caupi (C – controle e D – tratadas com 100 mM de NaCl). Peroxidação de lipídeos *in vivo* em segmentos apicais de raízes de feijão-caupi (E – controle e F – tratadas com 100 mM de NaCl). 132

Figura 2 – Concentração de H_2O_2 (A, B e C) e peroxidação de lipídeos (D, E e F) em raízes de plântulas de feijão-caupi submetidas 0 – controle e 100 mM de NaCl durante 180 minutos (A e D), 48 horas (B e E) e 4 dias (C e F). Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 133

Figura 3 – Atividade de oxidase de NADPH (NOX) de membrana plasmática (A), dismutase de superóxido (SOD) apoplástica (B) e peroxidase de fenóis (POX) de parede celular (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 24 e 48 horas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$). 135

Figura 4 – Concentração de H_2O_2 apoplástico (A) e teor de lignina (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 24 e 48 horas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$). 136

Figura 5 – Comprimento radicular (A), atividade de peroxidase de fenóis (POX) total (B) e atividade de peroxidase de fenóis (POX) apoplástica (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condições controle (0 mM de NaCl) e tratadas com 100 mM de NaCl durante 24 e 48 horas. Tratamentos: controle-24 horas (C-24); 100 mM de NaCl-24 horas (S-24); controle-48 horas (C-48); 100 mM de NaCl-48 horas (S-48); 100 mM de NaCl-24 horas $\rightarrow H_2O$ -24 horas (Rec). As letras sobre as barras indicam diferenças significativas 138

Figura 6 – Concentração de ascorbato apoplástico (A) e Teor de fenóis apoplásticos (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condições controle (0 mM de NaCl) e tratadas com 100 mM de NaCl durante 24 e 48 horas. Tratamentos: controle-24 horas (C-24); 100 mM de NaCl-24 horas (S-24); controle-48 horas (C-48); 100 mM de NaCl-48 horas (S-48); 100 mM de NaCl-24 horas $\rightarrow H_2O$ -24 horas (Rec). As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$). 139

Figura 7 – Atividade de dismutase de superóxido (SOD) total (A), atividade de dismutase de superóxido (SOD) apoplástica (B), concentração de H_2O_2 total (C) e concentração de H_2O_2 apoplástico (D) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condições controle (0 mM de NaCl) e tratadas com 100 mM de NaCl durante 24 e 48 horas. Tratamentos: controle-24 horas (C-24); 100 mM de NaCl-24 horas (S-24); controle-48 horas (C-48); 100 mM de NaCl-48 horas (S-48); 100 mM de NaCl-24 horas $\rightarrow H_2O$ -24 horas (Rec). 141

Figura 8 – Atividade de peroxidase de ascorbato (APX) total (A) e catalase (CAT) total (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condições controle (0 mM de NaCl) e tratadas com 100 mM de NaCl durante 24 e 48 horas. Tratamentos: controle-24 horas (C-24); 100 mM de NaCl-24 horas (S-24); controle-48 horas (C-48); 100 mM de NaCl-48 horas (S-48); 100 mM de NaCl-24 horas $\rightarrow H_2O$ -24 horas (Rec). As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$). 142

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 1 – O Na^+ pode induzir (indiretamente) a atividade dos canais de cálcio (CC) e da oxidase de NADPH (NOX). O cálcio intracelular também estimula a atividade de NOX. Esta enzima produz $\text{O}_2^{\cdot -}$ que é convertido a H_2O_2 por uma dismutase de superóxido (SOD) apoplástica. O H_2O_2 apoplástico pode ser degradado por uma peroxidase de parede celular (POX) que participa do processo de lignificação, oxidando fenóis apoplásticos ($\text{X} \rightarrow \text{X}^*$). O ácido ascórbico (Asc.) é degradado por uma oxidase de ascorbato (AO) e seus 154

ANEXOS

Anexo 1 – Aspecto morfológico das plântulas de feijão-caupi, cultivares Pitiúba (PIT-esquerda) e Pérola (PER-direita) do capítulo 2. T0 – aspecto das plântulas com 4 dias após semeio (antes da aplicação do tratamento); Controle – plântulas não-tratadas após 2 dias de tratamento; NaCl – plântulas tratadas com 100 mM de NaCl após 2 dias de tratamento. 156

Anexo 2 – Aspecto morfológico das plântulas de feijão-caupi, cultivares Pérola (acima) e Pitiúba (abaixo) do capítulo 3. T0 – aspecto das plântulas com 4 dias após semeio (antes da aplicação do tratamento); 0, 25, 50, 75 e 100 correspondem aos tratamentos de NaCl (em mmol L^{-1}) aplicados durante 2 dias em ambos os cultivares. 157

Anexo 3 – Aspecto morfológico das plântulas de feijão-caupi, cultivar Pitiúba do capítulo 4. T0 – aspecto das plântulas com 4 dias após semeio (antes da aplicação do tratamento); 0, 24, 48, 72 e 96 horas correspondem aos tempos de exposição às doses de 0 mM de NaCl (A), 50 mM (B) e 100 mM (C). 158

RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INDUZIDA POR ESTRESSE SALINO COMO UMA ESTRATÉGIA DE DEFESA OXIDATIVA EM RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPI

Autor: JOSEMIR MOURA MAIA

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. da Silveira

RESUMO

A presente tese propôs testar a hipótese de que a redução no comprimento de raízes de feijão-caupi, tratadas com NaCl, pode estar relacionada com mudanças na atividade de enzimas antioxidantes intracelulares e apoplásticas. Isto seria relacionado ao aumento e/ou controle da concentração de espécies reativas de oxigênio por mecanismos enzimáticos que controlam o crescimento. O trabalho foi subdividido em 5 capítulos independentes e interligados. O primeiro capítulo trata de uma revisão teórica do tema abordado na tese justificando-a e colocando em evidência a relevância científica do trabalho. Esta revisão trata de todos os aspectos abordados na tese, além de temas conexos como a descrição das vias de sinalização ativadas sobre estresse salino e algumas moléculas sinalizadoras. No capítulo 2, avaliou-se o efeito do NaCl no comprimento da raiz, conteúdo relativo de água (CRA), teor de massa seca, concentração de Na^+ e relação K^+/Na^+ além da atividade de superóxido (SOD), peroxidase de ascorbato (APX), peroxidase de fenóis (POX) e catalase (CAT) nas cultivares Pérola (sensível) e Pitiúba (resistente) de feijão-caupi, contrastantes quanto à resistência ao estresse salino e oxidativo no estágio de germinação. Este trabalho possibilitou concluir que embora as cultivares apresentem grau de sensibilidade diferenciado ao NaCl e estresse oxidativo, no estágio de germinação, essas características não são mantidas no estágio fisiológico de plântula. Além disso, os parâmetros avaliados não foram capazes de determinar diferenças contrastantes entre as duas cultivares que pudessem classificá-las como resistente e/ou susceptível ao sal. No intuito de compreender melhor os mecanismos antioxidantes das cultivares estudadas e avaliar se a concentração de NaCl interfere na resposta das mesmas, no capítulo 3 determinou-se comprimento radicular, CRA e concentração de Na^+ , além das atividades de SOD, APX, CAT e POX em raízes de plântulas tratadas com 0; 25; 50; 75 e 100 mM de NaCl durante dois dias. Este capítulo possibilitou concluir que a resposta no crescimento e na atividade de enzimas antioxidantes é dependente da dose e da cultivar. Ademais, verificou-se que um sistema envolvendo a atividade de POX poderia estar associado tanto à manutenção dos níveis de H_2O_2 quanto à redução no comprimento radicular. Para determinar se os mecanismos antioxidantes são dependentes do tempo de exposição ao NaCl, no capítulo 4, raízes de feijão-caupi da cultivar Pitiúba foram tratadas com 0; 50 e 100 mM de NaCl durante 0; 24; 48; 72 e 96 horas. Neste capítulo, demonstrou-se que a redução no comprimento radicular, depende da dose e do tempo de exposição ao NaCl e que os efeitos são acompanhados por um acúmulo de Na^+ nos tecidos, embora isto não leve a uma peroxidação de lipídeos. Este capítulo

também levantou dúvidas com relação ao envolvimento das enzimas SOD, APX, CAT e POX durante o crescimento. Para contribuir com a elucidação desses mecanismos o capítulo 5 envolveu pelo menos 3 experimentos onde as plântulas de feijão-caupi foram expostas a períodos de estresse de curta e longa duração. Nestes experimentos foram relacionados o metabolismo das espécies reativas de oxigênio de apoplasto com a atividade de oxidase de NADPH (NOX), SOD apoplástica e POX de parede celular. Uma explicação plausível para uma relação entre o estresse oxidativo e o estresse salino é que a resposta antioxidante pode simular parcialmente uma resposta hipersensitiva. As enzimas NOX, SOD apoplástica e POX de parede apresentaram um aumento de atividade precedido de uma explosão oxidativa. Adicionalmente o H_2O_2 pode funcionar como sinalizador celular de estresse e ser coadjuvante na lignificação da parede.

SALT-INDUCED GROWTH REDUCTION AS A STRATEGY OF OXIDATIVE DEFENSE IN COWPEA ROOTS

Author: JOSEMIR MOURA MAIA

Adviser: Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. da Silveira

ABSTRACT

In the present thesis, the hypothesis that the salt-induced impairment of root growth is due to changes in the symplastic and apoplastic antioxidant enzyme activity was investigated. Root growth impairment may be related to the enhancement and/or the control of the reactive oxygen species by enzymatic systems involved in growth regulation. This work was divided into five interconnected chapters. The first is a theoretical review of the approached subject and includes the scientific relevance of this study. This review details the oxidative mechanisms involved in root growth regulation under salinity, besides the signaling pathways activated under salt stress and related signaling molecules. In the chapter 2, the Pérola (sensitive) and Pitiúba (resistant) cultivars showing contrasting responses to salt stress at germination were evaluated during the seedling stage. Four-day-old seedlings were exposed to 100 mM NaCl for two days and it was determined the root length, dry weight, relative water content (RWC), Na^+ content, K^+/Na^+ ratio and the activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), phenol peroxidase (POX) and catalase (CAT). The obtained results were insufficient to categorize the tested cultivars as sensitive or resistant to salt stress at the seedling stage. The effect of the external NaCl concentration on the antioxidant responses in the studied cultivars was investigated in the chapter 3. It was assessed the root length, RWC, Na^+ content and the activity of SOD, APX, CAT, and POX in seedlings treated with 0; 25; 50; 75 and 100 mM NaCl during two days. The root growth impairment was more pronounced in the Pitiúba cultivar under 100 mM NaCl. Additionally, it was verified that a metabolic network involving the POX activity could be associated with the maintenance of H_2O_2 levels and the root growth restriction. In the chapter 4, a time-course of the antioxidant responses were assessed in the Pitiúba cultivar. Then, the seedlings were exposed to 0, 50 and 100 mM NaCl during 0; 24; 48; 72; and 96 h and the same variables determined in the previous experiment were evaluated again. It was demonstrated that the root length reduction depends on the NaCl concentration and the time of exposure. Although the root Na^+ content could suggest Na^+ toxicity, no lipid peroxidation was detected. The involvement of SOD, APX, CAT, and POX activity in root growth regulation was minutely investigated in the chapter 5. Thus, the seedlings were exposed to salt stress in short- and long-term experiments. The reactive oxygen species metabolism in the apoplastic fraction was associated with the activity of NADPH oxidase (NOX), apoplastic SOD and cell wall POX. It is possible that oxidative stress and salt stress are interconnected as the antioxidant response

could mimic the hypersensitive reaction. NOX, apoplastic SOD and cell wall POX showed enhanced activity preceding an oxidative burst. Additionally, H_2O_2 could act as an extracellular signal triggered by stress and play a role in cell wall strengthening.

**SALINIDADE INDUZ MECANISMOS OXIDATIVOS ENVOLVIDOS NO
CONTROLE DO CRESCIMENTO DE RAÍZES**

1.1. INTRODUÇÃO

Para as plantas, responder aos estresses abióticos é uma consequência do processo evolutivo e do aperfeiçoamento de uma variedade de respostas metabólicas. Estas envolvem mecanismos intrincados de percepção do estresse, possibilitando uma resposta eficiente a favor da sobrevivência (Fujita *et al.*, 2006). Neste contexto, o sistema radicular é comumente o primeiro órgão exposto à salinidade e, portanto, responsável pela eficiência na captação de água e manutenção do conteúdo hídrico do vegetal (Siemens e Zwiazek, 2003). Nesses órgãos, vários fenômenos metabólicos são observados quando as plantas são expostas a estresses abióticos relacionados com o solo. Frequentemente, observa-se o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), implicadas em diversos fenômenos de sinalização, homeostase e morte celular (Neill *et al.*, 2002; Moller *et al.*, 2007).

A produção de EROs sob estresse salino foi melhor observada em folhas e as respostas em raízes são pouco exploradas na literatura. De fato, existe uma deficiência notável na quantidade de estudos devotados ao entendimento das respostas oxidativas (vias de sinalização, mecanismos de danos e reparos). Mais ainda nas raízes onde a combinação entre as atividades enzimáticas, fluxo de substrato antioxidante e expressão de genes pode ser diferente daquela observada em folhas, embora esses dois órgãos compartilhem quase a mesma arquitetura enzimática (Ren *et al.*, 1999). Adicionalmente, devido ao metabolismo oxidativo ser essencialmente redundante em plantas superiores, pouco é conhecido a respeito da integração e seu funcionamento em organelas e citosol de raízes, especialmente sobre condições de estresse oxidativo induzido por salinidade (Mittler, 2002). Assim, este estudo propõe atualizar as informações sobre os mecanismos antioxidantes, descrevendo os principais processos de percepção, sinalização e ação oxidativa de raízes na resposta ao estresse salino.

1.2. OS COMPONENTES DA SALINIDADE COMO INDUTORES DE RESPOSTA E ESTRESSE OXIDATIVO

Em plantas, a salinidade causa tanto estresse iônico como osmótico (Figura 1). O estresse iônico ocorre quando, na planta ou tecido, a concentração de íons Na^+ alcança um patamar superior à concentração de íons K^+ (Maathuis e Amtmann, 1999). Este íon é considerado o principal nutriente inorgânico catiônico em plantas e está associado ao balanceamento de cargas no citoplasma, ativação de reações enzimáticas e regulação da pressão de turgor.

A troca do K^+ pelo Na^+ causa perturbações em todos os processos descritos acima e é iniciada pela competição do Na^+ pelos sítios de transporte de K^+ . A competição é motivada pelas similaridades físico-químicas entre esses dois íons e culmina em uma deficiência intracelular de K^+ . Neste compartimento, o Na^+ compete por sítios de ligação do K^+ e assim, inibe processos metabólicos cruciais dependentes desse íon (Maathuis e Amtmann, 1999).

Em adição ao estresse iônico, o estresse osmótico também pode ser causado pelo estresse salino (Figura 1). Este é provocado pela diminuição da disponibilidade de água para a planta e, em maiores proporções, pode causar uma diminuição na pressão de turgor dos tecidos além de reduzir o fluxo transpiratório e, conseqüentemente, alterar a transpiração, nutrição e crescimento do vegetal (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001; Zhu, 2002). Adicionalmente, tanto o estresse iônico como o osmótico podem causar estresse oxidativo (Zhu, 2001).

A aclimação das plantas aos estresses abióticos é freqüentemente associada ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($\text{HO}^{\cdot-}$), radicais peroxidrilas ($\text{HOO}^{\cdot-}$) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (Moller *et al.*, 2007). O H_2O_2 destaca-se como a principal ERO envolvida em mecanismos de sinalização durante estresses bióticos e abióticos além de ser o principal agente causador da morte celular programada (Slezak *et al.*, 2007) (Figura 1).

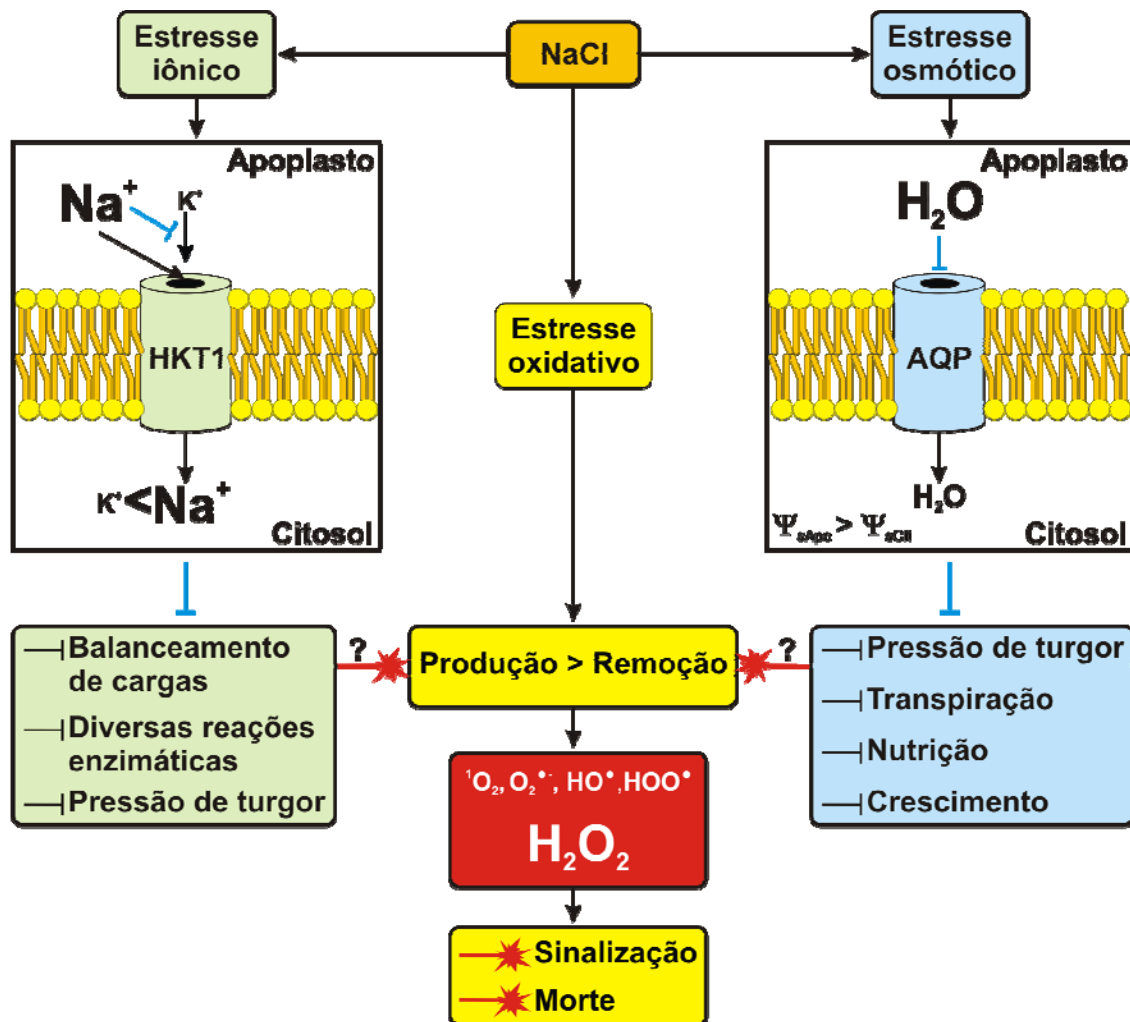


Figura 1 – Componentes do estresse salino. O tratamento salino pode causar estresse iônico, osmótico e oxidativo. O estresse iônico é causado pelo aumento da concentração de Na^+ no citosol, principalmente pela competição com o K^+ por canais de transporte, como o HKT1. No citosol, o Na^+ , em concentrações superiores aos do K^+ , provoca desbalanceamento de cargas, inibição de diversas reações enzimáticas dependentes de K^+ e interfere na pressão de turgor. O estresse osmótico é causado por mudanças no potencial de soluto (ψ_s) do apoplasto (Apo) e citosol (Cit). Esse efeito causa uma redução na taxa de translocação de água para o citosol através das aquaporinas (AQP) e, conseqüentemente, interfere na pressão de turgor, diminui a taxa transpiratória, interfere em processos nutricionais e por fim no crescimento. Tanto o estresse iônico como o osmótico pode causar estresse oxidativo através da interferência no balanço entre a produção e remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção de EROs pode ser destinada a sinalização e/ou culminar na morte do tecido ou da planta inteira.

Embora os dois componentes do estresse salino (iônico e osmótico) possam causar estresse oxidativo, pouco é conhecido a cerca da real contribuição desses componentes na produção de EROs em raízes. Entretanto, é amplamente conhecido que um desequilíbrio entre a produção e remoção desses radicais é a principal causa da produção de EROs e que todos os processos envolvem cascatas de sinalização altamente reguladas (Wang *et al.*, 2003; Fujita *et al.*, 2006; Moller *et al.*, 2007). Adiante esses aspectos são descritos em maiores detalhes.

1.3. PERCEPÇÃO E SINALIZAÇÃO NA RESPOSTA AO ESTRESSE IÔNICO, OSMÓTICO E OXIDATIVO

O estresse osmótico oriundo do estresse salino pode causar diminuição no crescimento vegetativo, similar ao que ocorre durante a seca (Munns e Tester, 2008). Esses mecanismos são estudados em experimentos que utilizam misturas de sais como a solução de Hoagland ou sais simples como o KCl (Munns e Tester, 2008) e solutos não iônicos como manitol e polietilenoglicol (PEG) (Sümer *et al.*, 2004; Munns e Tester, 2008). Contudo, no estresse salino, não apenas o estresse osmótico pode afetar o crescimento. Sümer *et al.* (2004) encontraram evidências de que a toxicidade do Na^+ (mas não do Cl^-), durante as primeiras fases do estresse salino em milho, pode também afetar o crescimento. Um possível mecanismo de resposta específica para o Na^+ é discutida abaixo.

1.3.1. Estresse iônico

A sinalização para o estresse iônico, causado pelo NaCl ocorre com a percepção de íons Na^+ , teoricamente antes ou depois de entrar na célula, ou ambos (Zhu, 2003). Shi *et al.* (2000) relatam que tanto o Na^+ extracelular quanto o intracelular podem ser percebidos por uma única proteína transmembrana (SOS1 – *salt overly sensitive*). Esta proteína também apresenta atividade antiporte Na^+/H^+ devolvendo o Na^+ para o meio extracelular e internalizando H^+ (Zhu, 2003) (Figura 2).

A SOS1 é central no controle do efluxo e influxo de Na^+ na célula. Esta proteína é ativada e ativa cascatas de sinalização específicas na resposta ao estresse iônico (Figura 2). Estudos recentes relatam que altas concentrações de Na^+ extracelular causam um aumento na atividade de SOS1 que provoca a diminuição do pH apoplástico (Chung *et al.*, 2008). Um canal de Ca^{+2} é estimulado pela variação da acidez e aumenta a taxa de influxo de Ca^{+2} (Knight *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 2008). Uma proteína denominada de SOS3 bem descrita como um sensor de Ca^{+2} citosólico interage com e ativa a SOS2, uma proteína quinase serina/treonina (Liu e Zhu, 1998; Ishitani *et al.*, 2000; Zhu, 2002).

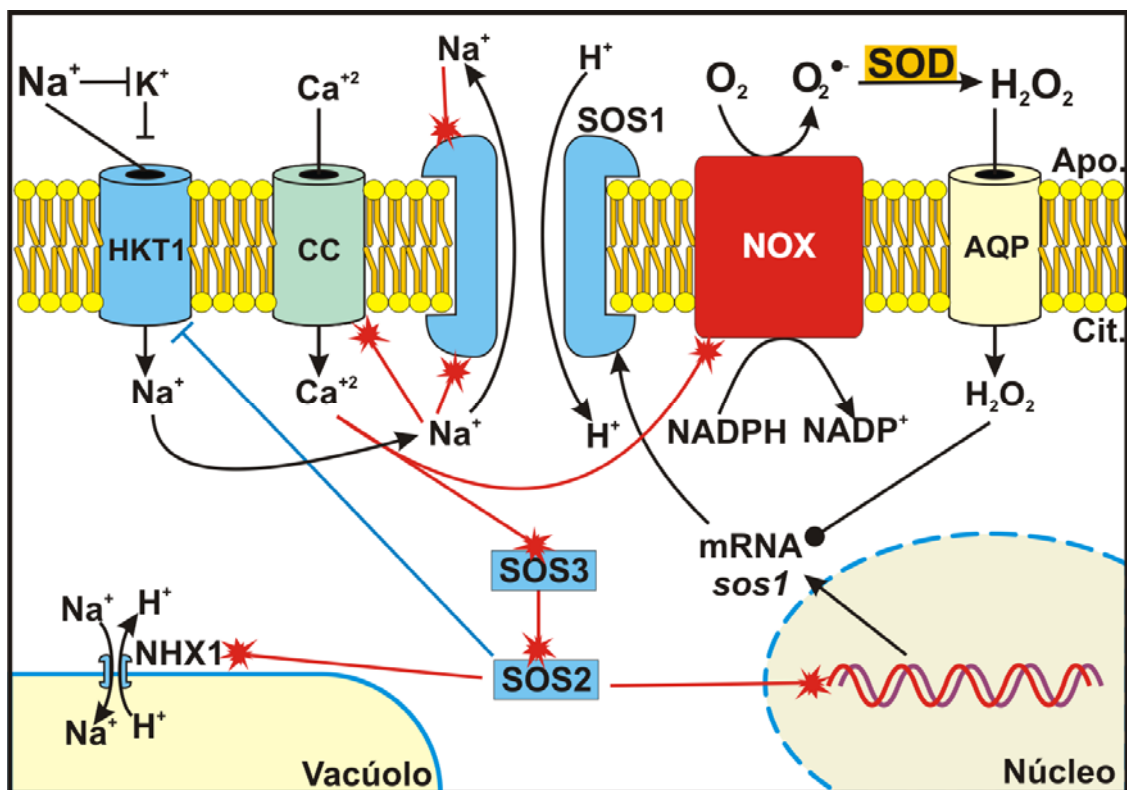


Figura 2 – Durante o estresse salino o Na^+ pode competir com o K^+ por canais de transporte. O Na^+ estimula a atividade antiporte da proteína SOS1 transmembrar tanto pela porção apoplástica (Apo.), quanto pelo lado citosólico (Cit.). Diferenças no potencial elétrico transmembrar provocados pelo Na^+ estimulam a entrada de Ca^{+2} , principalmente por uma proteína canal de cálcio (CC). O cálcio citoplasmático ativa a cascata SOS além de induzir a atividade de oxidase de NADPH (NOX). A proteína SOS2 contribui para a compartimentação do Na^+ , ativando a NHX1 e inibindo a atividade do canal HKT1. Além disso, a cascata SOS induz a síntese de transcritos de SOS1, controlando a atividade de compartimentação do Na^+ . Adicionalmente, a estabilidade dos transcritos *sos1* é promovida por H_2O_2 citoplasmático, possivelmente originado da atividade de NOX e transportado para o espaço intracelular por aquaporinas (AQP).

As proteínas $\text{SOS3} \rightarrow \text{SOS2}$ estão relacionadas à regulação de diversos mecanismos de resposta ao estresse iônico (Figura 2).

A proteína SOS2 controla o influxo de Na^+ através da inibição de canais HKT1 e canais não específicos de cátion (Xiong e Zhu, 2002; Zhu, 2003). Adicionalmente, a HKT1 está envolvida na ativação de uma V-ATPase tonoplástica e um antiportador Na^+/H^+ tonoplástico (NHX) (Xiong e Zhu, 2002). A cascata também é responsável pelo controle da expressão de genes *SOS1*, reforçando o potencial desta via em controlar o trânsito de Na^+ na membrana plasmática (Shi *et al.*, 2000; Zhu, 2002).

Estudos recentes em *Arabidopsis* também revelaram que o aumento nos níveis de mRNA do gene *SOS1* está relacionado em alguma proporção com a resposta a estresse oxidativo em raízes. De acordo com Chung *et al.* (2008) a estabilidade dos transcritos de *SOS1* é mediada por EROs, sugerindo um possível papel da proteína SOS1 na resposta de plantas ao estresse oxidativo. Neste modelo, os autores explicaram que a oxidase de NADPH (NOX – EC 1.6.3.1), uma enzima de membrana plasmática responsável pela produção de EROs no apoplasto, é parcialmente requerida para a geração dos EROs necessários para estabilizar os transcritos de SOS1 (Figura 2). Os autores relatam que a ativação do canal de Ca^{+2} , que ocorre no início da sinalização do estresse iônico, pode ser um ponto de convergência entre as sinalizações desse estresse e o aumento da atividade de NOX.

O Ca^{+2} , que é internalizado durante o estresse iônico, pode contribuir diretamente com o aumento da atividade de NOX. Além disso, o Ca^{+2} citoplasmático poderia provocar a ativação da via SOS e causar uma alcalinização do apoplasto e uma acidificação do citosol, momentâneas. Estas mudanças de pH poderiam também ativar a NOX. O H_2O_2 produzido no apoplasto seria então internalizado por aquaporinas (Neill *et al.*, 2002) e seria responsável pela manutenção da estabilidade dos transcritos SOS1 através de uma cascata de reações ainda não compreendida (Chung *et al.*, 2008). Contudo, os autores não confirmaram essa hipótese e abrem espaço para futuras especulações.

1.3.2. Estresse osmótico

Para resistir ao estresse osmótico causado por seca e estresse salino as plantas estimulam a acumulação de solutos compatíveis e antioxidantes (Hasegawa *et al.*, 2000). Os mecanismos de percepção do estresse osmótico foram sugeridos por Urao e colaboradores em 1999. Os autores sugeriram que uma proteína HK1 (histidina quinase) transmembranar em *Arabidopsis thaliana* é responsável pela percepção do estresse osmótico (Figura 3). Os transcritos de *AtHK1* são acumulados sobre condições de alta e baixa osmolaridade. A habilidade de *AtHK1* transmitir um sinal osmótico foi ensaiado em leveduras transformadas (Jonak *et al.* 2002). Contudo, a

As vias de quinases de proteínas ativadas por mitógeno (MAPK) são responsáveis por esses mecanismos de resposta. As MAPKs podem ser ativadas por hormônios, estresses abióticos, patógenos e elicitores derivados de patógenos, além de serem ativadas em estádios específicos do ciclo celular (Tena *et al.*, 2001).

a) Ácido abscísico (ABA)

Um dos mais conhecidos e melhores sinalizadores celulares da resposta ao estresse osmótico é o ácido abscísico (ABA) (Hu *et al.* 2005). Esta molécula pode atuar tanto como um sinalizador intracelular como intercelular e assim, exercer um papel vital na resposta das plantas ao estresse osmótico (Hu *et al.*, 2005). Além de ser responsável pela sinalização da síntese de solutos compatíveis (Zhao *et al.*, 2005), o ABA tem um papel chave na resposta a estresses abióticos e controle do crescimento (Zhu, 2002; Nambara e Marion-Poll, 2005).

Sharp e LeNoble (2002) indicam que as raízes podem ser as principais fontes de ABA e que estas podem atuar como reguladoras do crescimento, inclusive da parte aérea. A produção de ABA em raízes pode ser causada por uma indução do fechamento estomático em folhas e conseqüente redução do fluxo transpiratório (Seki *et al.*, 2007). O fechamento estomático causaria uma redução generalizada e severa na acumulação de matéria seca, induzida pela restrição na assimilação fotossintética de CO₂ (Souza *et al.*, 2004). Essas evidências sugerem que a diminuição do crescimento, provocada pelo estresse osmótico, pode envolver a interação de mecanismos metabólicos que estão localizados em diferentes órgãos.

Uma relação mais direta entre a redução do crescimento radicular, causada por estresse salino, e o acúmulo de ABA, causado pelo estresse osmótico, envolve mecanismos ainda não bem compreendidos. Sabe-se, no entanto, que o ABA pode estar relacionada com a regulação do crescimento em raízes, através da ativação e/ou intermediação da ativação de cascatas MAPKs juntamente com outros elementos como o Ca⁺² e H₂O₂ (Verslues e Zhu, 2007; Sharp e LeNoble, 2002; Hasegawa *et al.*, 2000). Adicionalmente, a relação entre Ca⁺², H₂O₂ e ABA pode envolver quinases de proteínas dependentes de Ca⁺² (CPKs) (Sheen, 1996) (Figura 3).

b) Cálcio (Ca^{+2})

Dentre os efetores da sinalização, o Ca^{+2} está envolvido em praticamente todas as respostas a estresses pela cascata MAPK (Knight e Knight, 2001). O Ca^{+2} citoplasmático controla vários processos bioquímicos através da ativação de quinases de proteínas dependentes de Ca^{+2} (CPKs). As CPKs destacam-se na resposta contra estresses abióticos (Figura 3). Em *Arabidopsis* as proteínas *AtCPK10* e *AtCPK11* são envolvidas na mediação do estresse salino e seca, enquanto que *AtCPK30* participam da resposta ao NaCl e ABA (Sheen, 1996). Em fumo, as proteínas *NtCPK2* e *NtCPK3* contribuem com a mediação de resistência ao estresse osmótico, enquanto a *NtCPK1* induz um arranjo de sinais, incluindo ABA e estresse salino (Ludwig *et al.*, 2004; Romeis *et al.*, 2001).

O Ca^{+2} também está envolvido no controle da concentração de H_2O_2 celular (Reddy e Reddy, 2004). Por exemplo, em *Arabidopsis* a proteína CPK1 está envolvida no aumento da atividade da NOX (Xing *et al.*, 2001). Por outro lado, as calmodulinas (CaM) podem ativar a catalase (uma proteína removedora de H_2O_2 citoplasmático) e inibir a atividade de NOX (Yang e Poovaiah, 2002; Neill *et al.*, 2002). Nesse contexto, o acúmulo de H_2O_2 parece ser tão importante quanto o ABA e Ca^{+2} na regulação do crescimento (Figura 3).

c) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Vários trabalhos relatam a relação do H_2O_2 como regulador do gravitropismo (Joo *et al.*, 2001; Apel e Hirt, 2004), ativador de cascatas MAPK para a síntese de moléculas reguladoras do crescimento celular (Tena *et al.*, 2001), além de participar como substrato enzimático para o amadurecimento precoce de raízes (Passardi *et al.*, 2004) e no controle da morte celular programada (Foyer e Noctor, 2005) (Figura 1). A regulação do gravitropismo pelo H_2O_2 foi inicialmente descrita por Joo *et al.* (2001). Em raízes de milho, a gravidade induz a geração assimétrica de H_2O_2 em raízes tal como uma aplicação assimétrica de auxinas. Adicionalmente, a aplicação assimétrica de H_2O_2 ou de antioxidantes promoveu ou inibiu o

gravitropismo, respectivamente, sem a interferência da atividade de catalase. Contudo, os mecanismos envolvidos nesse fenômeno ainda precisam ser elucidados (Neill *et al.*, 2002).

O crescimento também é regulado pelos níveis de H_2O_2 através da sua participação em cascatas de sinalização. Em *Arabidopsis*, o H_2O_2 ativa a MAPK3 e MAPK6 via ANP1 (uma proteína quinase de *Arabidopsis*) (Kovtun *et al.*, 2000). De acordo com Apel e Hirt (2004) o cenário em que se encontra atualmente o estudo sobre a contribuição do H_2O_2 , nas vias de sinalização, indica que vários estresses induzem a geração de EROs para ativação das cascatas de MAPKs (Figura 3).

Os eventos de sinalização por EROs envolvem Ca^{+2} e proteínas dependentes de Ca^{+2} , como as CaM (Knight e Knight, 2001; Bowler e Fluhr, 2000; Coelho *et al.*, 2002), ativação de proteína G (Baxter-Burrell *et al.*, 2002) e a ativação da sinalização por fosfolipídeos resultando na acumulação de ácido fosfatídico (Anthony *et al.*, 2004; Rentel *et al.*, 2004). Estudos recentes também revelaram que uma proteína quinase recentemente identificada (OXI1) exerce um papel central na ativação das proteínas MAPK3 e 6 (Rentel *et al.*, 2004). A cascata MAPK que envolve MAPK3 e 6 atua após a OXI1 e controla a ativação de diferentes mecanismos de defesa, em resposta ao estresse oxidativo (Kovtun *et al.*, 2000; Apel e Hirt 2004).

Os sinais de EROs também podem sofrer um amplificação através do envolvimento da NOX (Dat *et al.*, 2003). As amplificações podem ativar as vias de eliminação e resultar na supressão dos EROs em sítios celulares específicos (Dat *et al.*, 2003) ou resultar em processos que culminam na morte celular programada (Foyer e Noctor, 2005). A ativação da NOX está atribuída a vários intermediários da sinalização por H_2O_2 . O Ca^{+2} , a proteína G e as diferenças no potencial redox entre os compartimentos intra e extracelular são ativadores desta proteína (Foyer e Noctor, 2005). Não é difícil associar, portanto, a atividade de NOX com a amplificação do sinal de EROs (Figura 3).

1.4. AS PRINCIPAIS FONTES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM RAÍZES

A produção de EROs é um processo comum em diversas vias metabólicas durante a respiração aeróbica de plantas saudáveis (Moller *et al.*, 2007). O aumento na produção de EROs durante situações de estresse abiótico deve-se principalmente a um descompasso entre a produção e a remoção desses radicais de oxigênio (Moller *et al.*, 2007). Vários compartimentos celulares são responsáveis pela produção de EROs (Tabela 1). As cadeias transportadoras de elétrons (CTE) no cloroplasto e mitocôndrias produzem a maior parte dos EROs durante uma situação de estresse (Maxwell *et al.*, 1999; Moller, 2001; Foyer e Noctor, 2003).

A CTE do cloroplasto se destaca como o principal sítio de produção de EROs. No caso de tecidos não fotossintetizantes, como as raízes, o cloroplasto não está presente (ou pouco desenvolvido) e, portanto, a mitocôndria torna-se o principal sistema de produção de EROs (Maxwell *et al.*, 1999; Moller, 2001). Outros compartimentos celulares também produzem EROs como é o caso do apoplasto (Torres e Dangl, 2005) e peroxissomos (Del Rio *et al.*, 2006) que em raízes podem ser compartimentos tão ativos na produção de EROs quanto às mitocôndrias (Moller *et al.*, 2007) (Tabela 1).

A resposta ao estresse oxidativo ocorre de uma maneira bifásica (Zhao *et al.*, 2005). A primeira fase é caracterizada por uma acumulação de EROs no espaço apoplástico. Este fenômeno é comumente estudado em plantas atacadas por patógenos e é definido como explosão oxidativa (Neill *et al.*, 2002). Contudo, estresses abióticos como a salinidade (Shalata e Neumann, 2001; De Cnodder *et al.*, 2005) e estresse hídrico (Jiang e Zhang, 2002; Cnodder *et al.*, 2005) eventualmente podem induzir a acumulação de EROs no apoplasto.

A ocorrência de dois momentos distintos da explosão oxidativa de plantas é mais documentada para estresses bióticos (Sgherri *et al.*, 2007). O primeiro ocorre dentro de poucos minutos e é causado por mudanças no potencial redox do apoplasto, decorrente do aumento na produção de EROs nesse compartimento (Foyer e Noctor, 2005).

Tabela 01 – Produção de espécies reativas de oxigênio em raízes. Siglas: Apo - apoplasto; Cit – citosol; CTE – cadeia transportadora de elétrons; PC – parede celular; EROs – espécies reativas de oxigênio, HO• – radical hidroxil, HOO• – radical peroxil; Mit - mitocôndrias; Per – peroxissoma; MP - membrana plasmática; SOD – dismutase de superóxido

MECANISMO	LOCALIZAÇÃO	EROs
Oxidase de oxalato	Apo	H ₂ O ₂
Oxidase de aminas	Apo	H ₂ O ₂
Peroxidases	Apo	HO•, HOO•
Degradação do ascorbato	Apo	HO•, HOO•
Peroxidases, Mn ²⁺ e NADH	PC	O ₂ ••, H ₂ O ₂
Complexo I e III na CTE	Mit	O ₂ ••
Mn-SOD	Mit	H ₂ O ₂
Oxidase de glicolato	Per	H ₂ O ₂
β-oxidação de ácidos graxos	Per	H ₂ O ₂
Oxidase de xantina	Per	O ₂ ••
Oxidase de ureato	Per	O ₂ ••
Oxidase de NADH	Per	O ₂ ••
Cu/Zn-SOD	Per, Cit, Apo	H ₂ O ₂
Oxidase de NADPH	MP	O ₂ ••

Fonte: Atualizado a partir de Alscher *et al.* (2002); Mittler, 2002; Vranová *et al.* 2002; Passardi *et al.*, 2004; Grenn e Fry, 2005.

Por exemplo, sob o ataque de fungos avirulentos, essa primeira resposta ocorre dentro de 10 a 30 minutos e o segundo momento, ocorre entre 1 e 3 horas após o ataque do fungo (Zhao *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2005) e é dependente da intensidade do estresse (Apel e Hirt, 2004).

Sob o ataque de patógenos, o metabolismo é direcionado para o aumento da produção de EROs através da inibição dos mecanismos antioxidantes intracelulares (Foyer e Noctor, 2005). A planta pode se utilizar do "pool" de H₂O₂ formado no primeiro momento, tanto para o aumento de barreiras físicas (síntese de

parede secundária) (Passardi *et al.*, 2004), como para provocar a morte celular programada (PCD) em células afetadas (Foyer e Noctor, 2005). De acordo com Apel e Hirt (2004), mecanismos semelhantes à PCD também ocorrem durante estresses abióticos em folhas.

Contudo, ao invés da indução de uma explosão oxidativa secundária, a resposta a estresses abióticos é direcionada para acionar mecanismos de remoção de EROs. As diferenças entre a função dos EROs durante as respostas aos estresses bióticos e abióticos pode ser devido à ação de hormônios e diferenças entre as vias de sinalização e dos sítios de produção e/ou acumulação de EROs durante o estresse. Contudo, os mecanismos de explosão oxidativa causada por estresses abióticos, no tocante aos processos bioquímicos de resposta ainda não estão completamente esclarecidos (Apel e Hirt, 2004).

1.4.1. Apoplasto

O apoplasto atualmente é considerado o sítio celular onde oxidantes são primariamente produzidos e percebidos (Foyer e Noctor, 2005). Nesse compartimento, o controle do estado redox é frágil e facilmente detectável (Foyer e Noctor, 2005). Isto se deve a escassez de NAD(P)H e glutathione no apoplasto, somado ao controle rigoroso da degradação de ascorbato nesse compartimento (Passardi *et al.*, 2004).

Vários trabalhos indicam que as EROs são produzidas no apoplasto de raízes como resultado de mecanismos que acionam uma explosão oxidativa (Foreman *et al.*, 2003; Shin e Schachtman, 2004; Carol e Dolan, 2006). Alguns autores citam que a proteína NOX funciona como a principal produtora de EROs apoplástico (Carol e Dolan, 2006; Kim *et al.*, 2008). Este complexo protéico está localizado na membrana plasmática e é capaz de produzir $O_2^{\cdot-}$ utilizando NADPH citosólico como um doador de elétrons (Apel e Hirt, 2004) (Tabela 1). O $O_2^{\cdot-}$ é acumulado principalmente no apoplasto e pode ser convertido espontaneamente, ou por uma dismutase de superóxido (SOD) extracelular, para H_2O_2 (Foyer e Noctor, 2005).

Outras enzimas apoplásticas tais como as peroxidases (POX) são citadas como produtoras de EROs apoplástico (Passardi *et al.*, 2004). Apesar das POX serem comumente referidas como removedoras de H_2O_2 (Karkonen e Fry, 2006; Cavalcanti *et al.*, 2007), Liskay *et al.* (2003) e Berglund *et al.* (2002) abrem a possibilidade de uma nova função para essas enzimas (Tabela 1). Os autores explicam que em um ciclo alternativo, as POX poderiam ser convertidas para oxiferroperoxidases (também conhecidas como peroxidases complexo III) por duas vias diferentes, as quais possibilitariam a formação de vários EROs em condições especiais de pH (Halliwell *et al.*, 1977). Essas enzimas podem então ser consideradas bifuncionais, oxidando vários substratos fenólicos na presença de H_2O_2 , bem como produzindo outras formas de EROs (Passardi *et al.*, 2004).

Outro mecanismo de produção de EROs no apoplasto é encontrado na via de degradação do ascorbato (Tabela 1). Esta via foi recentemente localizada no apoplasto (Grenn e Fry, 2005) e é controlada pela atividade da oxidase de ascorbato (AO) (Pignocchi *et al.*, 2003). Miller e Fry (2001) identificaram que uma mistura contendo ascorbato e H_2O_2 pode gerar HO^\bullet . Mais adiante Grenn e Fry (2005) propõem que um dos produtos finais da degradação do ascorbato é H_2O_2 . Contudo, a produção de H_2O_2 por esta via, bem como pela atividade de POX é rigorosamente regulada pelo estado redox do apoplasto (Foyer e Noctor, 2005). Todos esses indícios somados levam a crer que o ascorbato apresenta um papel crucial no mecanismo de controle do estado redox apoplástico. Entretanto, não foi encontrado na literatura resultados que relacionassem a produção de EROs, sob estresse salino, com os mecanismos de produção de EROs apoplástico pelas POX ou pela via de degradação do ascorbato.

1.4.2. Mitocôndrias e peroxissomas

A quantidade de H_2O_2 produzido em mitocôndrias vegetais é menor do que em cloroplastos e peroxissomas quando expostos à luz (Foyer e Noctor, 2003), mas no escuro ou em tecidos não clorofilados, as mitocôndrias parecem ser as principais fontes de EROs (Maxwell *et al.*, 1999; Moller, 2001; Rhoads *et al.*, 2006).

Sob condições de estresse, as mitocôndrias produzem $O_2^{\cdot-}$, principalmente pelas desidrogenases de NAD(P)H (complexos I) e no complexo citocromo bc_1 (complexo III) (Tabela 1). Este processo resulta na formação de H_2O_2 primariamente através da ação de Mn-SOD específicas de mitocôndria (Rhoads *et al.*, 2006). Mittova *et al.* (2004) determinou que em raízes de tomate, tratadas com NaCl, o aumento na concentração de H_2O_2 mitocondrial resultou de um aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ neste compartimento. Contudo, informações a cerca dos efeitos da salinidade na produção de EROs mitocondriais ainda requer estudos (Mittova *et al.*, 2004).

Outro sítio importante para a produção de EROs intracelular são os peroxissomos. Estas organelas produzem $O_2^{\cdot-}$ como consequência normal de seu metabolismo (Tabela 1). Na fotorrespiração, a etapa de conversão do glicolato para o glioxalato é uma fonte natural de produção de EROs (Foyer e Noctor, 2000; Foyer e Noctor, 2003; Dat *et al.*, 2000; Wingler *et al.*, 2000). Outras vias podem catalisar a produção de H_2O_2 nessa organela como, por exemplo, a via metabólica da β -oxidação dos ácidos graxos e a oxidação de outros substratos (Dat *et al.*, 2000; Foyer e Noctor, 2003).

Oxidase de xantina, oxidase de ureato e oxidase de NADH também produzem $O_2^{\cdot-}$ como consequência da oxidação de seus substratos nos peroxissomos (Vranova *et al.*, 2002). A reação da oxidase de xantina é comumente utilizada em condições *in vitro* como fonte de $O_2^{\cdot-}$, capaz de produzir até 1 mol de $O_2^{\cdot-}$ durante a conversão da xantina em ácido úrico (Del Rio *et al.*, 2002; Del Rio *et al.*, 2003). O ácido úrico é então oxidado a alantoína gerando ainda H_2O_2 e CO_2 (Vranova *et al.*, 2002).

Há também a produção deste radical nas membranas dos peroxissomos, onde foi demonstrada a existência de uma pequena cadeia de transporte de elétrons, necessária para a regeneração do NAD^+ a ser novamente utilizado nos processos metabólicos desta organela (Del Rio *et al.*, 2002; Nyathi e Baker, 2006). Contudo, ainda não existem evidências de quais destas vias poderiam representar as principais fonte de EROs em raízes (Mittova *et al.*, 2004).

1.5. OS SISTEMAS DE ELIMINAÇÃO DE EROS E MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE REDOX

A célula vegetal e suas organelas – peroxissomas (Del Rio *et al.*, 2006), cloroplastos (Asada, 2006), e mitocôndrias (Moller, 2001; Moller, 2007; Navrot *et al.*, 2007) contém diversos sistemas enzimáticos e não enzimáticos para a remoção de EROs (Moller 2007; Apel e Hirt, 2004). A partição entre estes dois sistemas sob condições de estresse pode ser regulada pela concentração de O₂ no sistema (Blokina *et al.* 2003). A distinta localização subcelular e propriedades bioquímicas das enzimas antioxidantes, seus diferentes padrões de indução e expressão gênica, e a grande quantidade de removedores não-enzimáticos tornam o sistema antioxidante uma unidade flexível e versátil que pode controlar a acumulação e desintoxicação temporal e espacial das EROs (Del Rio *et al.*, 2002; Vranova *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004).

1.5.1. Antioxidantes não-enzimáticos

Antioxidantes como o ácido ascórbico (AsA), glutathione (GSH) bem como os tocoferóis, flavonóides, alcalóides e carotenóides participam ativamente do controle do “pool” de EROs nas células (Apel e Hirt, 2004). A GSH é oxidada pelos EROs formando glutathione oxidada (GSSG), enquanto que o AsA é oxidado para monodesidroascorbato (MDA) e desidroascorbato (DHA). No ciclo glutathione-ascorbato, o GSSG, MDA e DHA podem ser novamente convertidos em GSH e AsA para manter as EROs em concentrações suportáveis pela célula (Apel e Hirt, 2004).

Várias enzimas participam da manutenção do estado reduzido de AsA e GSH. A redutase de glutathione participa da redução de GSSG para GSH, enquanto a atividade de redutase de monodesidroascorbato (MDAR) e redutase de desidroascorbato (DHAR) reduz MDA e DHA, respectivamente. Todas essas enzimas usam o NADPH como força redutora (Tsugane *et al.*, 1999; Apel e Hirt, 2004).

Tanto o AsA como o GSH estão presentes em diversos compartimentos celulares, principalmente em cloroplastos, mitocôndrias e citosol (Potters *et al.*,

2002). O ascorbato participa de diversos processos celulares e, dentre esses, os mais importantes envolvem a proteção oxidativa (Apel e Hirt, 2004), a regulação da transição da fase G1 para S no ciclo celular (Potters *et al.*, 2002) e o controle do crescimento pelo alongamento das células (Passardi *et al.*, 2004). Para tanto, a via de síntese e degradação está distribuída nas mitocôndrias, citosol (Horemans *et al.*, 2000; Green e Fry, 2005) e apoplasto (Passardi *et al.*, 2004), indicando que os processos regulatórios que o ascorbato participa envolvem mecanismos localizados em diversos compartimentos subcelulares.

O GSH em células vegetais participa ativamente do metabolismo do enxofre, defesa antioxidante e remoção de compostos xenobióticos (Potters *et al.*, 2002). A reatividade química do grupo tiol da glutathiona, sua estabilidade relativa e sua alta solubilidade em água faz dessa molécula, particularmente, adequada a receber ou doar elétrons em reações fisiológicas (Potters *et al.*, 2002). Contudo, as evidências de que a principal via de síntese de GSH esteja localizada nos cloroplastos (Foyer *et al.*, 2001) faz desta molécula um alvo pouco explorado para o metabolismo oxidativo em raízes. Por outro lado, sua dinâmica metabólica, inclusive na atuação indireta da redução de DHA, torna a GSH imprescindível para o controle de EROs (Potters *et al.*, 2002).

As demais moléculas antioxidantes como flavonóides e carotenóides, relatadas acima, ainda são pouco exploradas na literatura e o seu papel efetivo na remoção de EROs em compartimentos subcelulares ainda merece atenção (Apel e Hirt, 2004). Contudo, estudos em *Arabidopsis* revelam que a superexpressão de uma hidrolase de β -caroteno pode causar um aumento na quantidade de xantofilas nos cloroplastos e resultar no aumento da tolerância ao estresse oxidativo causado por excesso de luminosidade (Davison *et al.*, 2002).

1.5.2. Antioxidantes enzimáticos

O sistema de defesa oxidativa enzimática das plantas inclui diversas enzimas antioxidantes nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas podemos citar as dismutases de superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), as peroxidases de ascorbato (APX; EC 1.11.1.1) e de fenóis (POX; EC 1.11.1.7) e as catalases (CAT; 1.11.1.6) que juntamente com outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa promovem a eliminação das EROs (Cavalcanti *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007) (Tabela 2). O balanço das atividades da SOD, APX e CAT é crucial na supressão dos níveis tóxicos de EROs na célula (Apel e Hirt, 2004). Nos últimos anos, um grande número de estudos tem focalizado no balanço dessas atividades, nas diferentes organelas celulares.

Segundo Alscher *et al.* (2002), dentro da célula, as SODs constituem a primeira linha de defesa contra os EROs, catalisando a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2 (Van Breusegem *et al.*, 2001) (Tabela 2). O radical $O_2^{\bullet-}$ é produzido em qualquer localização intracelular onde exista um transporte de elétrons, e, portanto, a ativação do O_2 pode ocorrer em diferentes compartimentos celulares (Dat *et al.*, 2000), incluindo mitocôndrias, cloroplastos, microsomos, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e citosol.

Não é surpresa, portanto, o fato das SODs estarem presentes em praticamente todas as regiões da célula. Além disso, o fato de que as membranas biológicas são impermeáveis a moléculas de O_2 carregadas, faz com que a presença de SOD próximo a sítios de produção de $O_2^{\bullet-}$ seja necessária. As SODs são classificadas, de acordo com o seu metal cofator, em três grupos: Fe-SOD, presente nos cloroplastos; Mn-SOD, presentes nas mitocôndrias e peroxissomos; e as Cu/Zn-SODs, presentes nos cloroplastos, no citosol e espaço extracelular (Alscher *et al.*, 2002).

Tabela 2 – Mecanismos de eliminação de espécies reativas de oxigênio em raízes, seus compartimentos celulares e respectivas espécies removidas

Mecanismo	Remoção (produto)	Localização celular
Ciclo glutathiona/ascorbato	H_2O_2 (H_2O)	Citosol, mitocôndrias, peroxissomos
Catalase	H_2O_2 (H_2O)	Mitocôndria (?), peroxissomas
Carotenóides e tocoferóis	1O_2 (O_2)	Plastídios
Oxidase alternativa	$O_2^{\cdot-}$	Mitocôndrias
Peroxidases de ascorbato	H_2O_2 (H_2O)	Citosol, mitocôndrias, membrana plasmática, microcorpos, glioxissomos, peroxissomos
Peroxidases de fenóis	H_2O_2 (H_2O)	Citosol, vacúolos, apoplasto, parede celular
Peroxidase de glutathiona	H_2O_2 (H_2O)	Citosol, retículo endoplasmático, mitocôndrias
	Hidroperóxidos de lipídeos	
	Outros hidroperóxidos	
Sistema peroxiredoxina	H_2O_2 (H_2O)	Citosol, mitocôndrias, núcleo
	Hidroperóxidos de alquil	
	Peroxinitrito	
Sistema tioredoxina	H_2O_2 (H_2O)	Citosol, mitocôndrias, via secretória
Sistema glutarredoxia	H_2O_2 (H_2O)	
Dismutase de superóxido	$O_2^{\cdot-}$ (H_2O_2)	Citosol, mitocôndrias, peroxissomos, microsomos, glioxissomos
Tiorredoxinas	H_2O_2	

Fontes: Dat *et al.*, 2000; Moller, 2001; Shigeoka *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004; D'arcy-Lameta *et al.*, 2006; Moller, 2007.

As APXs são consideradas as enzimas mais importantes na eliminação de H_2O_2 no citosol e nos cloroplastos (Asai *et al.*, 2004). As APXs utilizam o ascorbato como seu doador de elétrons específico para reduzir H_2O_2 à água (Tabela 2). As isoenzimas de APX são distribuídas em pelo menos quatro compartimentos celulares distintos: no estroma e ligadas à membrana dos tilacóides dos cloroplastos; ligada à membrana (mAPX) nos microcorpos, incluindo glioxissomos e peroxissomos; e no citosol (cAPX) (Shigeoka *et al.*, 2002; D'arcy-Lameta *et al.*, 2006). Há ainda isoformas de APX e de outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa na mitocôndria (mitAPX) (Chew *et al.*, 2003). Todas estas isoenzimas têm uma alta especificidade pelo ascorbato como doador de elétrons.

As Peroxidases (POX), da classe III de peroxidases de plantas, foram encontradas em vários compartimentos celulares como o citosol, vacúolo, apoplasto e parede celular (Maia, 2004; Mittler *et al.*, 2004) (Tabela 2). No entanto, ainda não é completamente claro o seu envolvimento na remoção das EROs, já que esta enzima também está envolvida no processo de lignificação e parada no crescimento em situações de estresse (Cavalcanti *et al.*, 2007).

A catalase é uma enzima que contém um grupamento heme em sua estrutura que catalisa a dismutação do H_2O_2 em água e O_2 (Zámocky e Koller, 1999) nos peroxissomos e glioxissomos pelas oxidases envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos, nas reações do glioxalato (fotorrespiração) e no catabolismo das purinas (Van Breusegem *et al.*, 2001) (Tabela 2). Múltiplas formas de catalase têm sido descritas em muitas espécies de plantas. Em milho, foram encontradas três isoformas (CAT-1, CAT-2 e CAT-3) cujos genes estão em cromossomos separados e são expressos distintamente com mecanismos regulatórios e localizações diferentes: CAT-1 e CAT-2 localizadas nos peroxissomos e citosol, enquanto que CAT-3 é provavelmente localizada na mitocôndria (Polidoros e Scandalios, 1997; Van Breusegem *et al.*, 2001).

Um grande número de outras enzimas também estão envolvidas na defesa antioxidativa. As peroxidases de glutathione (GPX) e as peroxidases de hidroperóxidos de lipídeos (PhGPX) são responsáveis pela proteção da membrana plasmática contra os EROs. Além destas enzimas, proteínas ligadas a metais, como a ferritina, que

seqüestram íons metálicos, ajudam na prevenção da formação do radical OH^{\bullet} via reações de Fenton ou Haber-Weiss (Mittler *et al.*, 2004).

Outras proteínas importantes para a defesa oxidativa são as oxidases alternativas (Tabela 2). Esta proteína funciona como desacopladora, desviando o fluxo normal de elétrons da CTE e, conseqüentemente, reduzindo a taxa de produção de EROs (Moller, 2001). Tiorredoxinas também são importantes para o controle da homeostase redox (Apel e Hirt, 2004). Estas são pequenas proteínas (12-14 kDa) com duas cisteínas no sítio ativo que podem formar um dissulfito na forma oxidada [Trx-(S-S)]. Elas estão envolvidas principalmente na regulação da atividade de enzimas do ciclo de Calvin, bem como na eliminação de hidroperóxidos e H_2O_2 (Moller, 2001).

Em mitocôndrias vegetais, duas tiorredoxinas e uma NADPH tiorredoxina redutase foram identificadas (Moller, 2001). Nenhuma destas foi descrita completamente quanto à funcionalidade em mitocôndrias vegetais, mas por analogia com mitocôndrias de leveduras e de mamíferos, possivelmente ela é envolvida na proteção contra estresse oxidativo (Moller, 2001). As tiorredoxinas também podem atuar na ativação da citrato sintase e oxidase alternativa, assim acionando a primeira linha de defesa contra EROs. Adicionalmente, também pode favorecer o fluxo de elétrons no ciclo de Krebs (Moller, 2001).

1.6. CRESCIMENTO DE RAÍZES E METABOLISMOS OXIDATIVO EM PLANTAS

Uma das respostas mais marcantes em plantas sob estresse salino é a redução no crescimento vegetativo (Munns e Tester, 2008). O foco das pesquisas sobre os mecanismos antioxidantes durante estresse salino está na respostas de folhas (Cavalcanti *et al.* 2007). Assim, estudos em raízes ainda merecem atenção. Adicionalmente, uma restrição no crescimento de plantas quase sempre está vinculada ao componente osmótico do estresse salino (Munns e Tester, 2008) o que gera contradições, pois em alguns casos, o estresse salino não causa modificações no *status* hídrico do sistema radicular (Lin e Kao, 2002).

Para a manutenção do crescimento diversos processos metabólicos, incluindo a ativação ou inibição de enzimas envolve o H_2O_2 . Apesar disso, os mecanismos que colaboram com a atividade de enzimas antioxidantes e processos de restrição de crescimento ainda não são completamente compreendidos. De todo modo, evidências apontam que peroxidases localizadas no apoplasto são as principais responsáveis pela redução na taxa de crescimento de vários órgãos vegetativos, através da síntese de lignina, em um processo correspondente a um amadurecimento precoce dos tecidos durante estresses abióticos (Passardi *et al.*, 2004) (Figura 4).

Estas peroxidases apoplásticas tanto podem participar da restrição, como da estimulação do crescimento, dependendo das condições fisiológicas do organismo (Passardi *et al.*, 2004). Os estímulos para o crescimento são proporcionados por uma via metabólica em que as peroxidases apoplásticas catalisam a formação de radicais hidroxil (HO^*) e peroxil (HOO^*). Os radicais produzidos degradam componentes da parede celular, induzindo o afrouxamento da parede e subseqüentemente o crescimento por alongamento celular (Passardi *et al.*, 2004) (Figura 4).

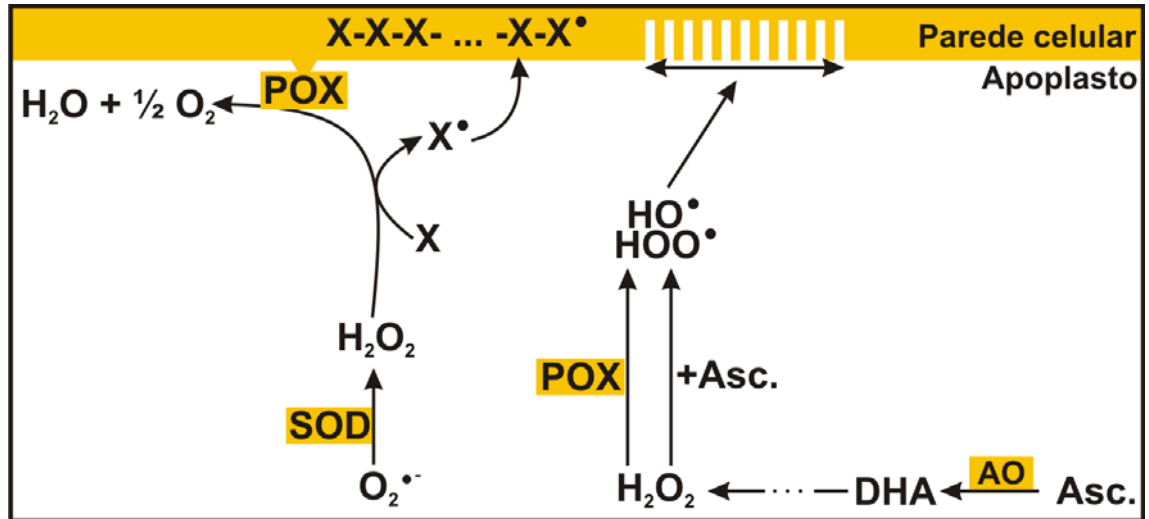


Figura 4 – Mecanismos de controle de crescimento pela atividade de peroxidases apoplásticas e pelo metabolismo do ascorbato. O $O_2^{\bullet -}$ produzido no apoplasto é convertido a H_2O_2 por uma SOD apoplástica. Uma peroxidase de fenóis (POX) ligada à parede celular degrada o H_2O_2 formando H_2O e O_2 , utilizando fenóis apoplásticos (X) como substratos redutores. Os radicais de fenóis (X^{\bullet}) são adjuvantes na formação de lignina. Esse polímero enrijece a parede celular, restringindo o crescimento da célula. Por outro lado, as POX também podem induzir o crescimento através da produção de radicais hidroxil (HO^{\bullet}) e peróxil (HOO^{\bullet}). Esses radicais degradam componentes da parede celular, permitindo o afrouxamento da parede e possibilitando o crescimento por alongamento das células. O ascorbato também participa do controle do crescimento. Essa molécula pode reagir com o H_2O_2 para a formação de HO^{\bullet} e HOO^{\bullet} ou ainda produzir H_2O_2 através da via de degradação.

O ascorbato também participa da regulação do crescimento. Esta molécula pode reagir com H_2O_2 produzindo radicais de oxigênio que induzem o crescimento, ou ainda contribuir para o aumento do “pool” de H_2O_2 no apoplasto através da via de degradação (Passardi *et al.*, 2004). Ademais, essas relações estão melhores compreendidas em estresses bióticos do que abióticos. Assim, é plausível explorar os mecanismos de defesa oxidativa em plantas sob estresse salino em uma abordagem que era anteriormente utilizada apenas em estudos de estresse biótico.

1.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pouco se sabe a respeito dos mecanismos antioxidantes que regulam o crescimento celular de raízes em condições de estresse salino. O que é conhecido está fragmentado e muitos dos elos entre as informações ainda são desconhecidos. Outros resultados são deduzidos a partir de respostas encontradas em folhas. Adicionalmente esses resultados não refletem ou representam integralmente os fenômenos de resposta oxidativa em tecidos vegetais cultivados no escuro, aclorofilados ou que apresentem somente metabolismo respiratório. Assim, mais estudos devem ser fomentados para uma melhor compreensão dos mecanismos de controle de crescimento que envolve o estresse oxidativo em raízes.

1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ANTHONY, R. G.; HENRIQUES, R.; HELFER, A.; MESZAROS, T.; RIOS, G.; TESTERINK, C.; MUNNIK, T.; DEAK, M.; KONCZ, C.; BOGRE, L. A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in Arabidopsis. **Embo Journal**, v.23, p.572-581, 2004.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, p.391-396, 2006.
- ASAI, N.; MATSUYAMA, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KUBO, A.; AONO, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D.; HAYASHI, H.; MULLINEAUX, P. M.; SAJI, H. Compensation for lack of a cytosolic ascorbate peroxidase in an Arabidopsis mutant by activation of multiple antioxidative systems. **Plant Science**, v.166, p.1547-1554, 2004.
- BAXTER-BURRELL, A.; YANG, Z. B.; SPRINGER, P. S.; BAILEY-SERRES, J. RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. **Science**, v.296, p.2026-2028, 2002.
- BERGLUND, G. I.; CARLSSON, G. H.; SMITH, A. T.; SZOKE, H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, v.417, p.463-468, 2002.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003.
- BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, v.5, p.241-246, 2000.
- BOYER, J. S. Plant Productivity and Environment. **Science**, v.218, p.443-448, 1982.
- CAROL, R. J.; DOLAN, L. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1829-1834, 2006.
- CAVALCANTI, F. R.; LIMA, J. P. M. S.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.591-600, 2007.

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v.163, p.563-571, 2004.

CHEW, O.; WHELAN, J.; MILLAR, A. H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.46869-46877, 2003.

CHUNG, J. S.; ZHU, J. K.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; SHI, H. H. Reactive oxygen species mediate Na⁺-induced SOS1 mRNA stability in Arabidopsis. **Plant Journal**, v.53, p.554-565, 2008.

COELHO, S. M.; TAYLOR, A. R.; RYAN, K. P.; SOUSA-PINTO, I.; BROWN, M. T.; BROWNEE, C. Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca²⁺ wave propagation in fucus rhizoid cells. **Plant Cell**, v.14, p.2369-2381, 2002.

D'ARCY-LAMETA, A.; FERRARI-ILIOU, R.; CONTOUR-ANSEL, D.; PHAM-THI, A. T.; ZUILY-FODIL, Y. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. **Annals of Botany**, v.97, p.133-140, 2006.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.57, p.779-795, 2000.

DAT, J. F.; PELLINEN, R.; BEECKMAN, T.; VAN DE COTTE, B.; LANGEBARTELS, C.; KANGASJARVI, J.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. **Plant Journal**, v.33, p.621-632, 2003.

DAVISON, P. A.; HUNTER, C. N.; HORTON, P. Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in Arabidopsis. **Nature**, v.418, p.203-206, 2002.

DE CNODDER, T.; VISSENBERG, K.; VAN DER STRAETEN, D.; VERBELEN, J. P. Regulation of cell length in the Arabidopsis thaliana root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: a matter of apoplastic reactions. **New Phytologist**, v.168, p.541-550, 2005.

DEL RIO, L. A.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GOMEZ, M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1255-1272, 2002.

DEL RIO, 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.

DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; GOMEZ, M.; BARROSO, J. B. Peroxisomes in oxidative stress and cell signaling. **Free Radical Research**, v.37, p.32-32, 2003.

EPSTEIN, E.; NORLYN, J. D.; RUSH, D. W.; KINGSBURY, R. W.; KELLEY, D. B.; CUNNINGHAM, G. A.; WRONA, A. F. Saline Culture of Crops - a Genetic Approach. **Science**, v.210, p.399-404, 1980.

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H. F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M. A.; LINSTED, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J. D. G.; DAVIES, J. M.; DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v.422, p.442-446, 2003.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, v.146, p.359-388, 2000.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v.17, p.1866-1875, 2005.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.355-364, 2003.

FOYER, C. H.; THEODOULOU, F. L.; DELROT, S. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. **Trends in Plant Science**, v.6, p.486-492, 2001.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, p.436-442, 2006.

GREEN, M. A.; FRY, S. C. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. **Nature**, v.433, p.83-87, 2005.

HALLIWELL, B. Generation of Hydrogen-Peroxide, Superoxide and Hydroxyl Radicals during Oxidation of Dihydroxyfumaric Acid by Peroxidase. **Biochemical Journal**, v.163, p.441-448, 1977.

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.

HOREMANS, N.; FOYER, C. H.; ASARD, H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. **Trends in Plant Science**, v.5, p.263-267, 2000.

HU, J. F.; LI, G. F.; GAO, Z. H.; CHEN, L.; REN, H. B.; JIA, W. S. Regulation of water deficit-induced abscisic acid accumulation by apoplastic ascorbic acid in maize seedlings. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.47, p.1335-1344, 2005.

ISHITANI, M.; LIU, J. P.; HALFTER, U.; KIM, C. S.; SHI, W. M.; ZHU, J. K. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. **Plant Cell**, v.12, p.1667-1677, 2000.

JIANG, M. Y.; ZHANG, J. H. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.2401-2410, 2002.

JONAK, C.; OKRESZ, L.; BOGRE, L.; HIRT, H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.415-424, 2002.

JOO, J. H.; BAE, Y. S.; LEE, J. S. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. **Plant Physiology**, v.126, p.1055-1060, 2001.

KARKONEN, A.; FRY, S. C. Effect of ascorbate and its oxidation products on H₂O₂ production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1633-1644, 2006.

KIM, S. G.; KIM, S. T.; KANG, S. Y.; WANG, Y.; KIM, W.; KANG, K. Y. Proteomic analysis of reactive oxygen species (ROS)-related proteins in rice roots. **Plant Cell Reports**, v.27, p.363-375, 2008.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, v.6, p.262-267, 2001.

KNIGHT, H.; TREWAVAS, A. J.; KNIGHT, M. R. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. **Plant Journal**, v.12, p.1067-1078, 1997.

KOVTUN, Y.; CHIU, W. L.; TENA, G.; SHEEN, J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p.2940-2945, 2000.

LIN, C. C.; KAO, C. H. Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.37, p.177-183, 2002.

LISZKAY, A.; KENK, B.; SCHOPFER, P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. **Planta**, v.217, p.658-667, 2003.

LIU, J. P.; ZHU, J. K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. **Science**, v.280, p.1943-1945, 1998.

LUDWIG, A. A.; ROMEIS, T.; JONES, J. D. G. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.181-188, 2004.

MAATHUIS, F. J. M.; AMTMANN, A. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. **Annals of Botany**, v.84, p.123-133, 1999.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.444, p.139-158, 2005.

MAIA, J. M. **Efeitos aditivos e interativos de tratamentos de seca e NaCl na resposta antioxidativa de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)].** (Dissertação de Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE., 2004. 129 p.

MAXWELL, D. P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.8271-8276, 1999.

MILLER, J. G.; FRY, S. C. Characteristics of xyloglucan after attack by hydroxyl radicals. **Carbohydrate Research**, v.332, p.389-403, 2001.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. 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.

MOLLER, 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.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

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

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.165-185, 2005.

NAVROT, N.; ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J. P. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.129, p.185-195, 2007.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.388-395, 2002.

NEILL, S. J.; BURNETT, E. C. Regulation of gene expression during water deficit stress. **Plant Growth Regulation**, v.29, p.23-33, 1999.

NYATHI, Y.; BAKER, A. Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v.1763, p.1478-1495, 2006.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v.9, p.534-540, 2004.

PIGNOCCHI, C.; FLETCHER, J. M.; WILKINSON, J. E.; BARNES, J. D.; FOYER, C. H. The function of ascorbate oxidase in tobacco. **Plant Physiology**, v.132, p.1631-1641, 2003.

POLIDOROS, A. N.; SCANDALIOS, J. G. Response of the maize catalases to light. **Free Radical Biology and Medicine**, v.23, p.497-504, 1997.

POTTERS, G.; DE GARA, L.; ASARD, H.; HOREMANS, N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.537-548, 2002.

REDDY, V. S.; REDDY, A. S. N. Proteomics of calcium-signaling components in plants. **Phytochemistry**, v.65, p.1745-1776, 2004.

REN, H. X.; WANG, Z. L.; CHEN, X.; ZHU, Y. L. Antioxidative responses to different altitudes in *Plantago major*. **Environmental and Experimental Botany**, v.42, p.51-59, 1999.

RENTEL, M. C.; LECOURIEUX, D.; OUAKED, F.; USHER, S. L.; PETERSEN, L.; OKAMOTO, H.; KNIGHT, H.; PECK, S. C.; GRIERSON, C. S.; HIRT, H.; KNIGHT, M. R. OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. **Nature**, v.427, p.858-861, 2004.

RHOADS, D. M.; UMBACH, A. L.; SUBBAIAH, C. C.; SIEDOW, J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant Physiology**, v.141, p.357-366, 2006.

ROMEIS, T.; LUDWIG, A. A.; MARTIN, R.; JONES, J. D. G. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. **Embo Journal**, v.20, p.5556-5567, 2001.

SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.296-302, 2007.

SGHERRI, C.; QUARTACCI, M. F.; NAVARI-IZZO, F. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1152-1160, 2007.

SHALATA, A.; NEUMANN, P. M. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.2207-2211, 2001.

SHARP, R. E.; LENOBLE, M. E. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.33-37, 2002.

SHEEN, J. Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. **Science**, v.274, p.1900-1902, 1996.

SHI, H. Z.; ISHITANI, M.; KIM, C. S.; ZHU, J. K. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p.6896-6901, 2000.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1305-1319, 2002.

SHIN, R.; SCHACHTMAN, D. P. Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.8827-8832, 2004.

SIEMENS, J. A.; ZWIAZEK, J. J. Effects of water deficit stress and recovery on the root water relations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. **Plant Science**, v.165, p.113-120, 2003.

SLESAK, I.; LIBIK, M.; KARPINSKA, B.; KARPINSKI, S.; MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochimica Polonica**, v.54, p.39-50, 2007.

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGO, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.45-56, 2004.

SREENIVASULU, N.; SOPORY, S. K.; KISHOR, P. B. K. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. **Gene**, v.388, p.1-13, 2007.

SUMER, A.; ZORB, C.; YAN, F.; SCHUBERT, S. Evidence of sodium toxicity for the vegetative growth of maize (*Zea mays* L.) during the first phase of salt stress. **Journal of Applied Botany and Food Quality-Angewandte Botanik**, v.78, p.135-139, 2004.

TENA, G.; ASAI, T.; CHIU, W. L.; SHEEN, J. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.392-400, 2001.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.397-403, 2005.

TSUGANE, K.; KOBAYASHI, K.; NIWA, Y.; OHBA, Y.; WADA, K.; KOBAYASHI, H. A recessive arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. **Plant Cell**, v.11, p.1195-1206, 1999.

URAO, T.; YAKUBOV, B.; SATOH, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in arabidopsis functions as an osmosensor. **Plant Cell**, v.11, p.1743-1754, 1999.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVA, E.; DAT, J. F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

VERSLUES, P. E.; ZHU, J. K. New developments in abscisic acid perception and metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.447-452, 2007.

VRANOVA, E.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1227-1236, 2002.

WANG, W. X.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v.218, p.1-14, 2003.

WINGLER, A.; LEA, P. J.; QUICK, W. P.; LEEGOOD, R. C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v.355, p.1517-1529, 2000.

XING, T.; WANG, X. J.; MALIK, K.; MIKI, B. L. Ectopic expression of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.1261-1264, 2001.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Salt Tolerance. In SOMERVILLE, C. R.; MEYEROWITZ, E. M. (eds) **The Arabidopsis Book**. American Society of Plant Biologists: Rockville, 2002.

YANG, T. B.; POOVAIAH, B. W. An early ethylene up-regulated gene encoding a calmodulin-binding protein involved in plant senescence and death. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.38467-38473, 2000.

ZAMOCKY, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v.72, p.19-66, 1999.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.23, p.283-333, 2005.

ZHAO, J.; HU, Q.; GUO, Y. Q.; ZHU, W. H. Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca²⁺ influx and the oxidative burst. **Plant Science**, v.161, p.423-431, 2001.

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.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.247-273, 2002.

INTERCAPÍTULO 1

O estudo que se segue foi elaborado para contribuir na elucidação das relações entre os mecanismos antioxidantes e o crescimento vegetativo de plantas. A proposta foi originada de observações feitas em minha dissertação de mestrado, onde o tratamento salino em plântulas de feijão-caupi causou aumento significativo da atividade de peroxidases de fenóis, associada à diminuição brusca do comprimento radicular (Maia, 2004)*. Apesar dessas evidências, vários questionamentos ainda merecem esclarecimentos: 1. cultivares da mesma espécie podem apresentar mecanismos de resposta antioxidante diferentes?; 2. quais enzimas antioxidantes são efetivamente afetadas pelo estresse salino?; 3. que mecanismos antioxidantes são responsáveis por alterações no crescimento radicular?; 4. qual a relação entre estresse oxidativo e a diminuição das taxas de crescimento radicular? Para responder a esses questionamentos, estudos fisiológicos-bioquímicos que esclareçam as relações entre crescimento e estresse oxidativo em raízes de plantas são necessários.

Em nossa compreensão, acreditamos que essa correlação possa ser um efeito do metabolismo oxidativo, causado pelo estresse salino, diretamente em mecanismos que controlam o crescimento. Assim, foram realizados experimentos que respondessem os questionamentos e que cumprissem com os objetivos e testasse a hipótese abaixo relacionada.

Para estruturar os experimentos e resultados, esta tese foi dividida em 5 capítulos independentes, formatados como protótipos de artigos. Nos capítulos que se seguem algumas citações, metodologias e até mesmo partes das introduções e discussões foram repetidas entre capítulos. Assim, antecipadamente, peço desculpas ao leitor pela formatação escolhida para este trabalho monográfico, justificando que a independência dos capítulos facilitará a formatação das futuras publicações.

* MAIA, J. M. Efeitos aditivos e interativos de tratamentos de seca e NaCl na resposta antioxidativa de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)]. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE., 2004. 129 p.

HIPÓTESE

A redução no comprimento de raízes de feijão-caupi, tratadas com NaCl, está relacionada com mudanças nas atividades de enzimas antioxidantes apoplásticas e intracelulares. Estas controlam os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares e apoplásticas e participam do controle do crescimento.

OBJETIVOS

A presente tese tem como objetivo central descrever a atividade de enzimas antioxidantes totais e de apoplasto, em raízes de plântulas de feijão-caupi tratadas com NaCl. Adicionalmente, as análises servirão para comparar as respostas antioxidativas em cultivares, doses, tempos de exposição e compartimentos celulares diferentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Avaliar os parâmetros de crescimento (comprimento relativo, massa seca, conteúdo relativo de água, danos de membrana e peroxidação de lipídeos) e atividade de enzimas antioxidantes em duas cultivares de feijão-caupi submetidas ao tratamento com NaCl;
- 2 – Avaliar a resposta de parâmetros de crescimento e atividade de enzimas antioxidantes sob diferentes doses e tempos de exposição ao NaCl;
- 3 – Relacionar as atividades de enzimas antioxidantes presentes no extrato total e no apoplástico com os efeitos do tratamento salino durante o crescimento de raízes de feijão-caupi.

**RESPOSTA OXIDATIVA INDUZIDA POR NaCl EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE
DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI**

2.1. INTRODUÇÃO

A salinidade causada por NaCl, no solo e/ou na água de irrigação, é um problema ambiental comum, sendo considerado um dos principais fatores limitantes da produção agrícola (Hernández *et al.*, 1999). A inibição da taxa de crescimento é um dos principais efeitos causados pelo NaCl (Lin e Kao, 2002). Nas raízes, primeiro órgão afetado pela salinidade, esta inibição é freqüentemente relacionada ao decréscimo da elasticidade da parede celular nas zonas de elongação (Lin e Kao, 2002). Como consequência, a planta sofre prejuízos nos processos de absorção, acúmulo e manutenção do conteúdo de água nos tecidos (Siemens e Zwiazek, 2003).

Dentre as respostas fisiológicas-metabólicas das plantas face aos estresses abióticos tais como seca, salinidade, altas temperatura, etc., as oxidativas são bem relatadas (Mittler, 2002; Cavalcanti *et al.*, 2004; Neto, 2006). O estresse oxidativo é gerado através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou a inibição dos sistemas de defesa antioxidante (Asada, 1992; Alscher *et al.*, 1997). As principais EROs produzidas pelo metabolismo aeróbico são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}), o oxigênio singlete (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies químicas podem ser vistas tanto como indicadores de danos celulares, como também mensageiros envolvidos nas vias de sinalização de defesa a diversos tipos de estresses (Mittler, 2002; Moller *et al.*, 2007).

Como mecanismos de defesa contra os EROs, destacam-se as enzimas antioxidantes, amplamente distribuídas na maioria dos compartimentos celulares (Moller *et al.*, 2007). As defesas enzimáticas de plantas incluem as dismutases de superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), catalases (CAT; EC 1.11.1.6), peroxidases de ascorbato (APX; EC 1.11.1.1) e as peroxidases de fenóis (POX; EC 1.11.1.7) que, juntamente com outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, promovem eliminação de EROs (Hernández *et al.*, 2001). Esse sistema enzimático atua de maneira coordenada, promovendo respostas imediatas a pequenas mudanças no ambiente externo da planta (Cavalcanti *et al.*, 2007). As SOD constituem a principal estratégia de eliminação de $O_2^{\bullet-}$ e sua ação enzimática resulta na formação de H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 produzido é eliminado pela CAT e várias classes de peroxidases, as quais são

encontradas em peroxissomas, citosol e mitocôndrias, dismutando H_2O_2 em H_2O e O_2 (Neto *et al.*, 2006). Peroxidasas (APX e POX) são distribuídas por toda a célula e catalisam a redução de H_2O_2 para H_2O . As APX são consideradas as mais importantes peroxidasas de plantas na remoção de H_2O_2 (Noctor e Foyer, 1998). As POX exercem um papel importante nas respostas fisiológicas, incluindo lignificação, metabolismo das auxinas, resistência e regulação do crescimento (Cavalcanti *et al.*, 2007).

Estudos recentes demonstram que folhas e raízes de feijão-caupi em diferentes estádios fisiológicos, quando expostas a estresse salino, embora apresentem danos fisiológicos aparentes, podem exibir modulações na atividade de SOD, APX, CAT e POX, o que poderia representar uma estratégia de resistência ao estresse oxidativo (Cavalcanti *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007, Silveira *et al.*, 2005). Contudo, algumas questões ainda merecem esclarecimento: i. plantas caracterizadas como sensíveis em apenas um determinado estágio fisiológico podem ser consideradas sensíveis ao estresse salino durante todo o ciclo fenológico?; ii. plântulas resistentes e sensíveis ao estresse salino e oxidativo apresentam diferenças nas respostas antioxidativas?

Na tentativa de contribuir com estas questões, o presente estudo tem como objetivo caracterizar alguns parâmetros fisiológicos (comprimento radicular, produção de biomassa, conteúdo relativo de água, danos de membranas e peroxidação de lipídeos), bem como a resposta antioxidante (atividades de dismutase de superóxido, catalase, peroxidase de ascorbato e peroxidase de fenóis), em raízes de plântulas de duas cultivares de feijão-caupi, Pérola (sensível) e Pitiúba (resistente) contrastantes, no estágio de germinação, quanto à resistência ao estresse salino e oxidativo (Freitas, 2006; Jorge, 2006). O trabalho pretende testar a hipótese de que plantas sensíveis ao sal no estágio de germinação são também sensíveis ao estresse oxidativo no estágio de plântula.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal, condições de cultivo

Sementes de feijão-caupi das cultivares (cv.) Pérola (sensível) e Pitiúba (resistente), contrastantes quanto à resistência aos estresses salino e oxidativo (Freitas, 2006; Jorge, 2006; Aragão, 2007) foram utilizadas neste trabalho. Para o plantio, as sementes foram desinfetadas pela imersão em solução 0,1 % de hipoclorito de sódio por 5 minutos, seguido de 3 lavagens consecutivas em H₂O deionizada. As sementes foram semeadas em papel de germinação (dimensões 28 x 38 cm) completamente umedecido com H₂O deionizada (2,5 mL g⁻¹ papel) de acordo com Vieira e Carvalho (1994). Os papéis foram então enrolados e reunidos, formando conjuntos de 4 rolos, envoltos com mais uma folha de papel de germinação embebida em água. Os sistemas foram envoltos em sacos plásticos e mantidos em câmara de crescimento a 27±2 °C, umidade relativa de 80±10 % e fotoperíodo de 12 horas com 240 μmol m⁻² s⁻¹ de radiação luminosa fotossinteticamente ativa.

2.2.2. Tratamento e coleta das plântulas

As etapas de plantio, tratamento e coleta foram adaptadas de Maia (2004). Quatro dias após o semeio (DAS), metade das plântulas das duas cultivares foram transferida para papéis de germinação embebidos com solução de NaCl a 100 mM e a outra metade, para papéis embebidos apenas com água deionizada (controle), com a mesma razão papel x H₂O iniciais. Os conjuntos retornaram às mesmas condições de câmara de crescimento descritas anteriormente. Após dois dias de exposição ao tratamento salino (6^º DAS), todas as plântulas foram coletadas. Uma parte do material foi utilizada para determinações de comprimento radicular, conteúdo relativo de água, massa seca, concentração de K⁺ e Na⁺ e vazamento de eletrólitos. A outra parte foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e conservada a -80 °C para determinação da peroxidação de lipídeos e atividades

enzimáticas. Para a análise estatística foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2 x 2 (doses de NaCl x cultivares) e 3 repetições. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

2.2.3. Comprimento radicular, massa seca, conteúdo relativo de água e relação K^+/Na^+

O comprimento radicular foi tomado no 6º DAS, utilizando 26 plântulas como amostragem e medindo o comprimento das raízes a partir da base até o ápice. O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado a partir da determinação da massa fresca (MF), massa totalmente túrgida (MT) e massa seca (MS), utilizando 3 segmentos radiculares de 5 cm, mais próximos da base, seguindo metodologia descrita por Cairo (1995), conforme a relação: $CRA = (MF - MS / MT - MS) \times 100$. O teor de massa seca foi tomado a partir de 5 raízes secas em estufa por 48 h a 50 °C. A relação $mg\ MS\ raiz^{-1}$ foi determinada dividindo-se a massa seca total pelo número de raízes utilizadas para a determinação. As concentrações de K^+ e Na^+ foram determinadas conforme Viégas *et al.* (2001). Os íons K^+ e Na^+ foram extraídos a partir de 50 mg de tecidos secos e pulverizados em 10 mL de H_2O deionizada. As suspensões foram aquecidas a 100 °C por 1 h, filtradas e a partir do sobrenadante foram realizadas leituras em fotômetro de chama. Os dados foram expressos na relação K^+/Na^+ (Maathuis e Amtmann, 1999).

2.2.4. Danos de membranas e peroxidação de lipídeos

Os danos de membranas foram analisados de acordo com Cavalcanti *et al.* (2004). Dez segmentos de 5 cm da região apical das raízes foram colocados em contato com 20 mL de água deionizada em tubos de ensaios na temperatura ambiente (25 °C) por 6 horas. Após isso, a solução que estava em contato com os segmentos foi utilizada para obtenção da primeira leitura em condutivímetro (L_1). A solução retornou aos tubos fechados e foi então fervida juntamente com os discos

foliares em banho-maria a 100 °C por 60 minutos. Depois de resfriar à temperatura ambiente, a solução foi novamente utilizada para obtenção de nova leitura (L_2). O resultado foi expresso em % de danos de membranas, de acordo com a equação: $\%DM = (L_1/L_2) \times 100$.

A peroxidação de lipídeos foi mensurada pelo método de Heath e Packer (1968). 500 mg de matéria fresca de raízes foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e ácido tricloroacético (TCA) 1 % (m/v). A suspensão foi centrifugada a 10.000 x *g* por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A mistura reacional contendo 500 µL de amostra mais 2 mL de reagente contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5 % (m/v), dissolvido em TCA a 20 % (m/v) foi incubada em banho-maria a 95 °C por 1 hora. As leituras foram realizadas nas absorvâncias de 532 e 660 nm. A segunda leitura foi subtraída da primeira para obtenção da leitura específica e a peroxidação de lipídeos foi calculada através do coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath e Packer, 1968) e expressa como nmol MDA-TBA g⁻¹MS.

2.2.5. Atividade de dismutase de superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX) e peroxidase de fenóis (POX)

A extração das proteínas foi realizada de acordo com Cavalcanti *et al.*, 2004. As amostras foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 contendo ácido L-ascórbico 1 mM e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM. Os macerados foram centrifugados a 13.000 x *g*, por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante, considerado fração de proteínas solúveis totais, foi coletado e armazenado -80 °C. Para a atividade de SOD, alíquotas de 100 µL de extrato foram transferidas para tubos de ensaio protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 µM de azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT). A reação foi iniciada pela adição de 2 µM de riboflavina e a concomitante transferência dos tubos para uma câmara iluminada com lâmpadas fluorescentes de 30 W. As leituras foram tomadas a 560 nm. Uma UA (unidade de atividade) foi considerada como a quantidade de

enzima requerida para inibir 50 % da foto-redução do NBT em comparação com tubos na ausência da enzima (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade de SOD foi expressa em UA g⁻¹MS min⁻¹.

A atividade de catalase (CAT) foi determinada de acordo com o método de Sudhakar *et al.* (2001). Alíquotas de 50 µL do extrato foram adicionadas a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30 °C, acrescido de 20 mM de H₂O₂. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm. A atividade de CAT foi expressa em nmol H₂O₂ g⁻¹MS min⁻¹.

A atividade de peroxidase de ascorbato (APX) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 100 µL dos extratos foram transferidas para tubos de ensaio. Ao meio de reação foram adicionados 2,7 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0, contendo ácido L-ascórbico 0,8 mM. O experimento foi iniciado pela adição de 2 mM de H₂O₂ ao meio de reação, observando o decréscimo da absorbância a 290 nm. A atividade de APX foi expressa em µmol ascorbato g⁻¹MS min⁻¹.

A atividade de peroxidase de fenóis (POX) nos tecidos radiculares foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Alíquotas de 20 µL do extrato de proteínas foram transferidas para tubos de ensaio e a estes, adicionados 4,9 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, contendo 20 mM de ácido pirogálico e 20 mM de H₂O₂. A mistura foi incubada à temperatura ambiente (25 °C), por um período de 1 minuto e a reação interrompida pela adição de 0,5 mL de 0,5 % (v/v) de H₂SO₄. As leituras de absorbância foram tomadas a 420 nm. A atividade de POX foi expressa em nmol purpurogalina g⁻¹MS min⁻¹.

2.3. RESULTADOS

Para determinar o efeito do estresse salino nos mecanismos antioxidativos do feijão-caupi, plântulas das cv. Pérola e Pitiúba com quatro dias de idade, foram tratadas por 2 dias com 100 mM de NaCl. O comprimento radicular decresceu em ambas as cultivares (Figura 1A). No cv. Pérola houve decréscimo de apenas 16,7 %, enquanto que no cv. Pitiúba houve decréscimo de 33 %. O conteúdo relativo de água não apresentou diferenças significativas em ambas as cultivares (Figura 1B). O teor de massa seca não diferiu significativamente entre os tratamentos e seus respectivos controles (Figura 1C).

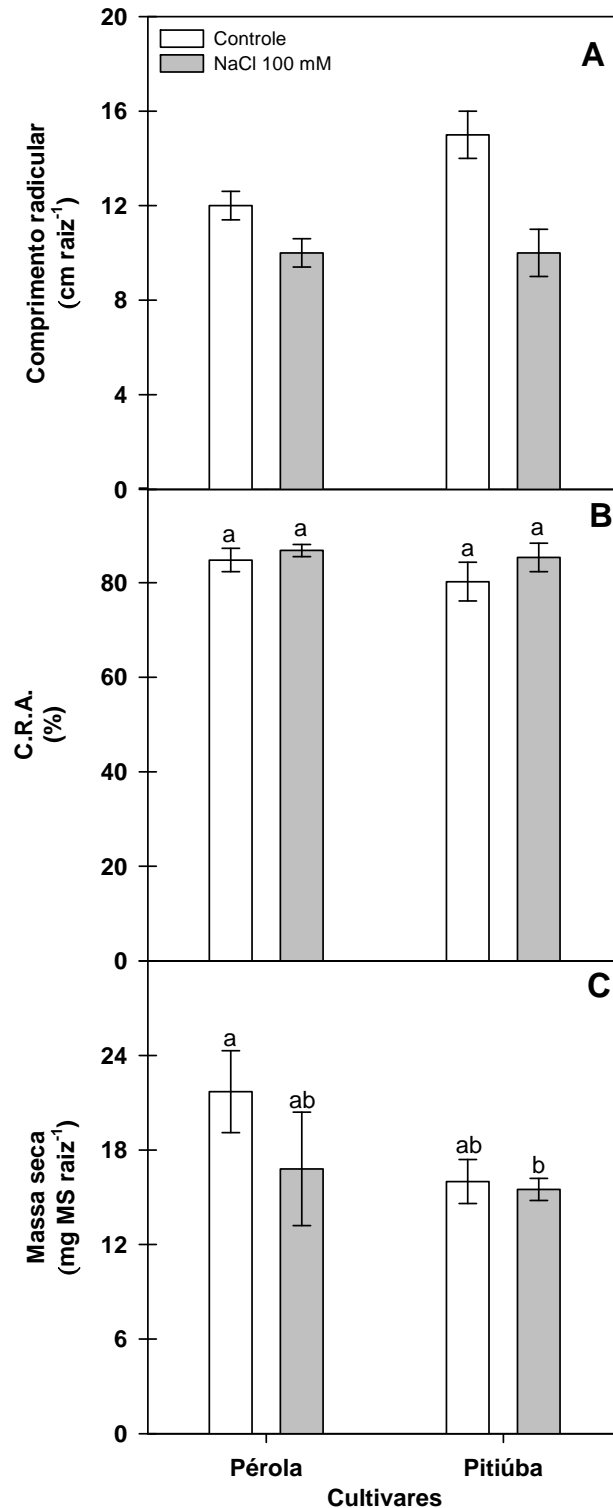


Figura 1 – Comprimento radicular (A), conteúdo relativo de água (B), massa seca (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi das cultivares Pérola (à esquerda de cada gráfico) e Pitiúba (à direita de cada gráfico) com 4 dias de idade, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 2 dias. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

A concentração de Na^+ aumentou, em média, 77,23 % em ambas as cultivares (Figura 2A) enquanto que a razão K^+/Na^+ decresceu 72,5 % (Figura 2B). A cv. Pérola apresentou 53 % a mais de danos de membranas constitutivos do que a cv. Pitiúba. (Figura 3A). Entretanto, foi observado incremento de 28,2 % nos danos da cv. Pérola e 67 % na cv. Pitiúba, quando tratadas com 100 mM de NaCl. A peroxidação de lipídeos decresceu significativamente nas cv. Pérola (28,1 %) e Pitiúba (30,4 %) (Figura 3B).

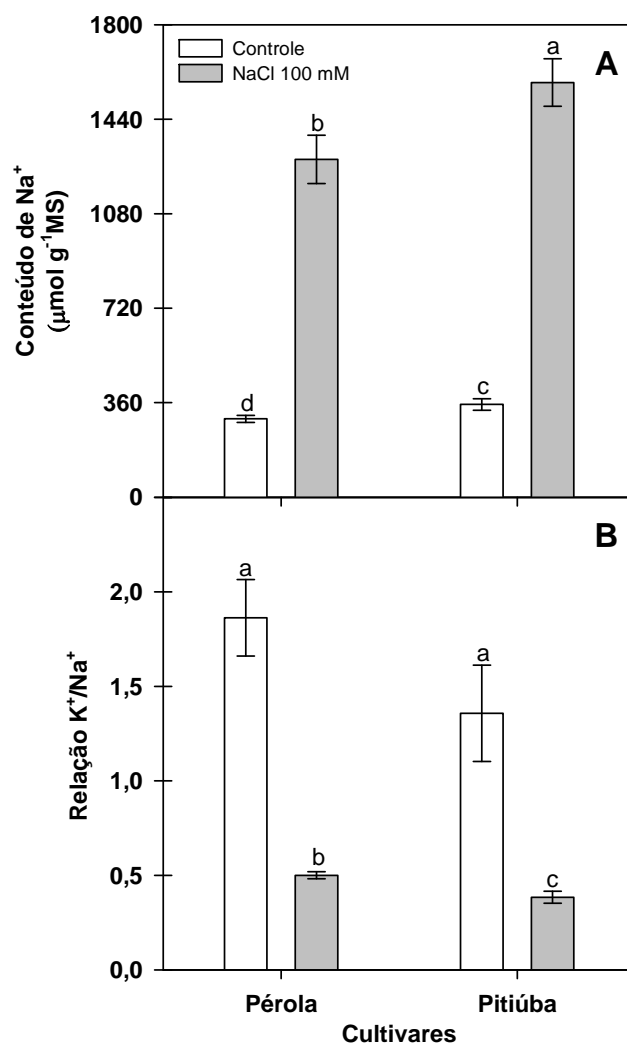


Figura 2 – Conteúdo de Na^+ (A) e razão K^+/Na^+ (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi das cultivares Pérola (à esquerda de cada gráfico) e Pitiúba (à direita de cada gráfico) com 4 dias de idade, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 2 dias. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

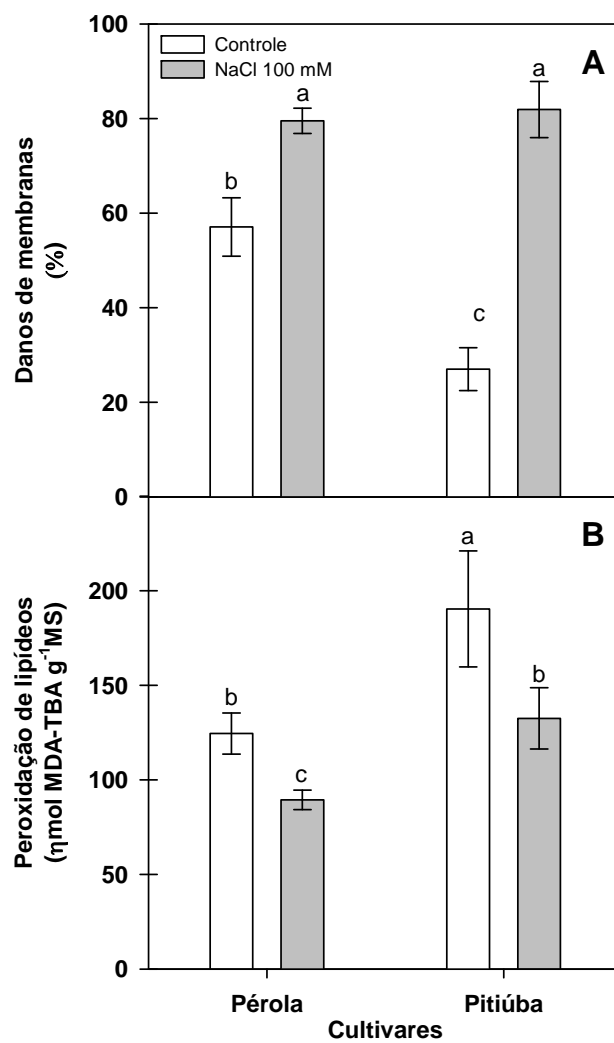


Figura 3 – Danos de membranas (A) e peroxidação de lipídeos (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi das cultivares Pérola (à esquerda de cada gráfico) e Pitiúba (à direita de cada gráfico) com 4 dias de idade, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 2 dias. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto à atividade de dismutase de superóxido (SOD), a cv. Pérola não apresentou variação significativa (Figura 4A). Contrariamente, a cv. Pitiúba apresentou um decréscimo de 25,6 % na atividade desta enzima. A atividade de peroxidase de ascorbato (APX) reduziu (40 %) em ambas cultivares na mesma proporção (Figura 4B). A atividade de catalase (CAT) decresceu cerca de 40 % na cv. Pitiúba (Figura 4C). A atividade de peroxidase de fenóis (POX) aumentou em ambas cultivares (Figura 4D). Entretanto, a atividade de POX aumentou apenas 13,3 % na cv. Pérola enquanto que houve aumento de 38 % na atividade desta enzima nas raízes da cv. Pitiúba.

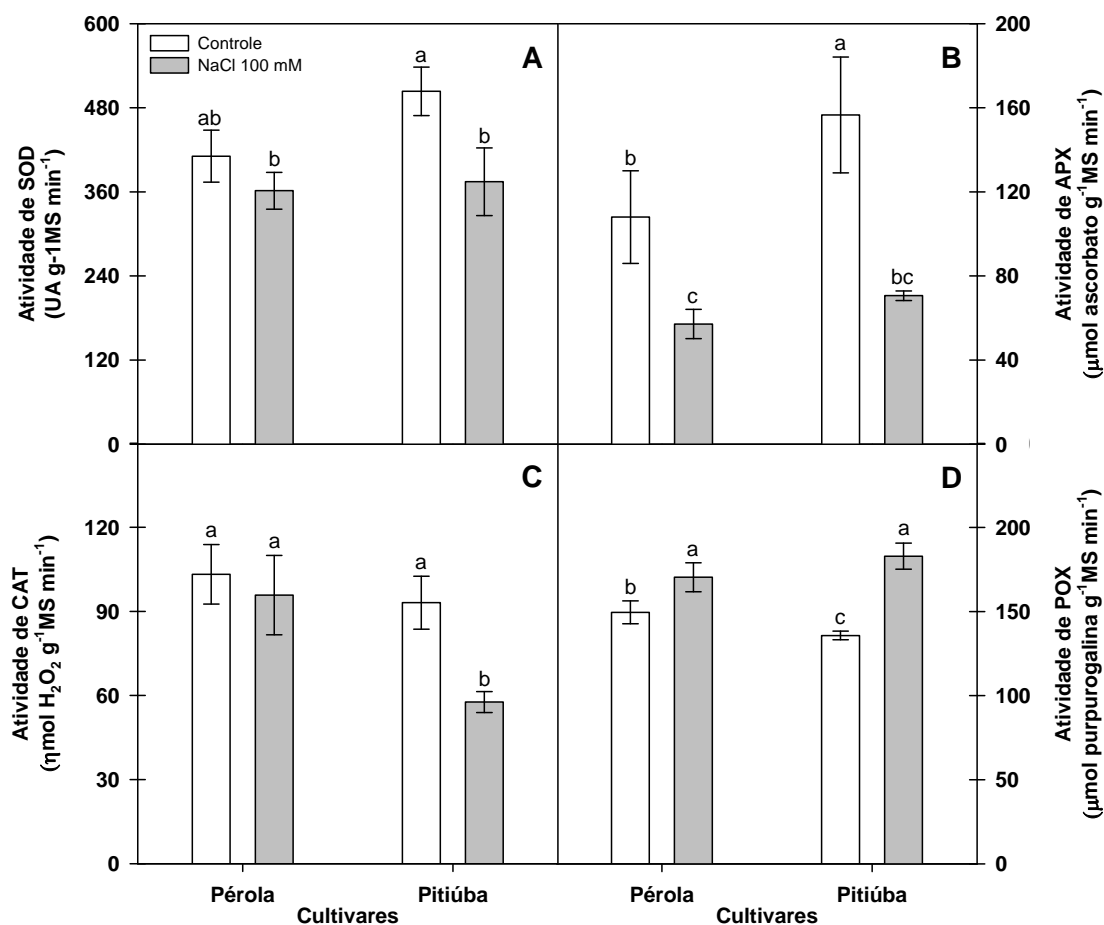


Figura 4 – Atividade de SOD (A), APX (B), CAT (C) e POX (D) em raízes de plântulas de feijão-caupi das cultivares Pérola (à esquerda de cada gráfico) e Pitiúba (à direita de cada gráfico) com 4 dias de idade, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 2 dias. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

2.4. DISCUSSÃO

Para testar a hipótese de que plântulas de feijão-caupi sensíveis ao NaCl no estágio de germinação podem não apresentar diferenças na resposta antioxidativa, no estágio de plântulas, foram utilizadas uma cultivar sensível (Pérola) e outra resistente (Pitiúba) ao sal, descritas previamente por Freitas (2006). No 6º dia após o semeio (DAS) as raízes apresentaram redução no comprimento radicular que não foi relacionado com o CRA e com o teor de massa seca (Figura 1). Adicionalmente, o elevado conteúdo de Na^+ nas raízes (cerca de $1400 \mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$), associado à razão K^+/Na^+ , determinante do grau de toxicidade de íon Na^+ nos tecidos (Maathuis e Amtmann, 1999), apresenta indícios de que o efeito iônico foi mais importante para a redução no comprimento radicular do que o efeito osmótico (Figura 2).

Uma redução no teor de massa seca e crescimento relativo em raízes de caupi, tratadas com NaCl, já foi observado por Cavalcanti *et al.* (2007). Os autores atribuíram esses efeitos a um estresse osmótico em folhas. Lin e Kao (2000) também observaram uma inibição do crescimento de folhas e raízes de cereais sob estresse salino, mas não relacionaram esse efeito a um decréscimo no turgor. Os resultados apresentados sugerem que o efeito iônico foi mais importante para a redução do comprimento radicular do que a componente osmótica do estresse salino. Apesar disso, nenhum dos cinco parâmetros estudados (comprimento radicular, CRA, massa seca, conteúdo de Na^+ e razão K^+/Na^+), foi suficiente para diferenciar o nível de resistência/sensibilidade das cultivares no estágio de plântula.

O tratamento salino comumente também causa aumento nos danos de membranas em caupi (Cavalcanti *et al.*, 2004) e outras espécies como trigo (Mandhania *et al.*, 2006) e *Chrysanthemum morifolium* (Hossain *et al.*, 2006) (Figura 3). Apesar de na cv. Pitiúba o tratamento com NaCl ter causado uma maior elevação nos danos de membrana, a cv. Pérola já apresentava níveis constitutivos elevados. Em contraste, a peroxidação de lipídeos, indicada pela formação de aldeído malônico, decresceu significativamente em ambas as cultivares (Figura 3B). A diminuição do índice de peroxidação de lipídeos em vegetal é um fenômeno pouco

comum, embora já observado em caupi (Cavalcanti *et al.*, 2007) e milho (Neto *et al.*, 2006). Esses resultados evidenciam que o NaCl não causou danos oxidativos significativos nos lipídeos de membranas. Sugere-se, portanto, que o aumento nos danos de membranas possa ser um mecanismo ligado ao aumento da fluidez da membrana plasmática, ou com o ataque de espécies reativas de oxigênio a outras moléculas como proteínas (Dionisio-Sese e Tobita, 1998; Yang *et al.*, 2004). Resta esclarecer, contudo, se em raízes de feijão-caupi o nível da peroxidação de lipídeos está relacionado a um mecanismo antioxidativo eficiente, que seria responsável pela manutenção dos níveis de EROs.

Para verificar o padrão de resposta antioxidante enzimático, as atividades de SOD, CAT, APX e POX foram avaliadas. Vários autores correlacionam o aumento das atividades dessas enzimas com a resistência de plantas à salinidade (Hernandez *et al.*, 1995; Sreenivasulu *et al.*, 2000; Benavides *et al.*, 2000; Cavalcanti *et al.*, 2004, Cavalcanti *et al.*, 2007). Hernandez *et al.* (1994) reportou que a atividade catalítica de isoenzimas de SOD de plantas de feijão-caupi diminui em função da concentração de sal *in vitro*. Embora a compartimentação de Na⁺ nas raízes e dentro das células não tenha sido determinada no presente estudo, o elevado conteúdo de íons, em paralelo com o decréscimo na atividade de SOD, é consistente com a possibilidade de que o sal inibe diretamente a atividade desta enzima *in vivo* (Dionisio-Sese e Tobita, 1998). A inibição da atividade de SOD de feijão-caupi foi previamente observada por Cavalcanti *et al.* (2007). Os autores sugerem que, o efeito osmótico ou iônico, pode ter afetado diretamente a integridade da proteína SOD e, subseqüentemente, causado redução na atividade.

Comparativamente, enquanto a cv. Pitiúba apresenta maior atividade constitutiva de APX, em relação à cv. Pérola, esta apresenta maior atividade constitutiva de CAT. Cavalcanti *et al.* (2007) trabalhando com plantas adultas, da mesma cultivar, apresentaram resultados diferentes aos obtidos nesse trabalho. É válido, portanto, questionar se a resposta obtida foi dependente do estágio vegetativo, ou se as respostas observadas foram provocadas por componentes diferentes do estresse salino.

Estudos em soja com APX e CAT demonstram que as plantas compensam a inibição da atividade de CAT pelo aumento na atividade de APX e na concentração de glutathiona e ascorbato, além da expressão isoformas de Mn-SOD (Palatnik *et al.*, 2002). Em outro estudo Asai *et al.* (2004) apresentaram evidências de que plantas de *Arabidopsis* compensam a atividade de APX pelo aumento na expressão de CAT. As discrepâncias observadas entre os controles das cultivares nas atividades de SOD, APX e CAT sugerem, portanto, que essas plântulas apresentam mecanismos diferenciados de resistência ao estresse oxidativo. Contudo, nas plantas estudadas, as atividades de SOD, APX e CAT sugerem que a tendência de queda na peroxidação de lipídeos não foi causada pela atividade destas enzimas (Figura 4A, B e C).

Outras enzimas, portanto, podem atuar como removedoras de EROs em raízes tratadas com NaCl (Mittler, 2002). Dentre elas as POX, da classe III de plantas, são encontradas em vários compartimentos celulares como citosol, vacúolo, apoplasto e parede celular (Maia, 2004; Mittler *et al.*, 2004). No entanto, ainda não é completamente claro o seu envolvimento na remoção de EROs, já que esta enzima também está envolvida no processo de lignificação e restrição do crescimento em situações de estresse (Cavalcanti *et al.*, 2007).

No presente trabalho a atividade de POX aumentou significativamente em ambas as cultivares. Esse aumento poderia combater a produção de EROs nos diversos compartimentos celulares, compensando as reduções nas atividades de SOD, APX e CAT. Adicionalmente, a atividade de POX corrobora a redução no comprimento radicular sem um decremento no teor de massa seca dos tecidos.

2.5. CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstrou que as cultivares estudadas, embora apresentem grau de sensibilidade diferenciado ao NaCl e estresse oxidativo, no estágio de germinação, essas características não são mantidas no estágio fisiológico posterior. Os parâmetros avaliados não foram capazes de determinar diferenças contrastantes entre as duas variedades que pudessem classificá-las como resistente e/ou susceptível ao sal no estágio de plântula. Ambas as cultivares podem reagir eficazmente ao estresse oxidativo causado por tratamento salino, cada uma com mecanismos fisiológicos específicos. Mais estudos que abordem o papel das enzimas antioxidantes na proteção de danos oxidativos, durante estresse salino, devem ser realizados para esclarecer as relações entre a fisiologia do crescimento e a resposta antioxidante de feijão-caupi.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.224-233, 1997.

ARAGÃO, T. C. F. R. **Danos oxidativos e o envelhecimento de sementes de feijão caupi**. (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2007. 129p.

ASADA, K. Ascorbate Peroxidase - a Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzyme in Plants. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.235-241, 1992.

ASAI, N.; MATSUYAMA, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KUBO, A.; AONO, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D.; HAYASHI, H.; MULLINEAUX, P. M.; SAJI, H. Compensation for lack of a cytosolic ascorbate peroxidase in an Arabidopsis mutant by activation of multiple antioxidative systems. **Plant Science**, v.166, p.1547-1554, 2004.

BEAUCHAM.C; FRIDOVIC.I Superoxide Dismutase - Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-8, 1971.

BENAVIDES, M. P.; MARCONI, P. L.; GALLEGOS, S. M.; COMBA, M. E.; TOMARO, M. L. Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.27, p.273-278, 2000.

CAIRO, P.A.R. **Relações hídricas de plantas**. Vitória da Conquista: UESB, 1995. 32p.

CAVALCANTI, F. R.; LIMA, J. P. M. S.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.591-600, 2007.

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v.163, p.563-571, 2004.

DIONISIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, v.135, p.1-9, 1998.

FREITAS, J. B. S. **Respostas fisiológicas ao estresse salino de duas cultivares de feijão caupi**. (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2006. 113 p.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts .2. Role of Electron Transfer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.850-&, 1968.

HERNANDEZ, A. J.; ADARVE, M. J.; GIL, A.; PASTOR, J. Soil salination from landfill leachates: Effects on the macronutrient content and plant growth of four grassland species. **Chemosphere**, v.38, p.1693-1711, 1999.

HERNANDEZ, J. A.; DELRIO, L. A.; SEVILLA, F. Salt Stress-Induced Changes in Superoxide-Dismutase Isozymes in Leaves and Mesophyll Protoplasts from *Vigna-unguiculata* (L) Walp. **New Phytologist**, v.126, p.37-44, 1994.

HERNANDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMENEZ, A.; BARCELO, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O₂(-)/H₂O₂ 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.

HERNANDEZ, J. A.; OLMOS, E.; CORPAS, F. J.; SEVILLA, F.; DELRIO, L. A. Salt-Induced Oxidative Stress in Chloroplasts of Pea-Plants. **Plant Science**, v.105, p.151-167, 1995.

HOSSAIN, Z.; MANDAL, A. K. A.; DATTA, S. K.; BISWAS, A. K. Development of NaCl-tolerant strain in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through in vitro mutagenesis. **Plant Biology**, v.8, p.450-461, 2006.

JORGE, A. R. C. **Expressão de proteínas durante a germinação de duas cultivares de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) sob estresses osmótico e salino.** (Monografia de Graduação). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2006. 129p.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.

LIN, C. C.; KAO, C. H. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.30, p.151-155, 2000.

LIN, C. C.; KAO, C. H. Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.37, p.177-183, 2002.

MAATHUIS, F. J. M.; AMTMANN, A. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. **Annals of Botany**, v.84, p.123-133, 1999.

MANDHANIA, S.; MADAN, S.; SAWHNEY, V. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, v.50, p.227-231, 2006.

MAIA, J. M. **Efeitos aditivos e interativos de tratamentos de seca e NaCl na resposta antioxidativa de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)].** (Dissertação de Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE., 2004. 129 p.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

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

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

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.

NETO, A. D. D.; PRISCO, J. T.; ENEAS, J.; DE ABREU, C. E. B.; GOMES, 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.

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.

PALATNIK, J. F.; VALLE, E. M.; FEDERICO, M. L.; GOMEZ, L. D.; MELCHIORRE, M. N.; PALEO, A. D.; CARRILLO, N.; ACEVEDO, A. Status of antioxidant metabolites and enzymes in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, v.162, p.363-371, 2002.

SIEMENS, J. A.; ZWIAZEK, J. J. Effects of water deficit stress and recovery on the root water relations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. **Plant Science**, v.165, p.113-120, 2003.

SILVEIRA, J. A. G.; LIMA, J. P. M. S.; CAVALCANTI, F. R.; MAIA, J. M.; VIÉGAS, R. A. Salt induced oxidative response in plants: damage or protection? In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (Ed.) **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE – Imprensa universitária, 2005, p.106-117.

SREENIVASULU, N.; GRIMM, B.; WOBUS, U.; WESCHKE, W. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). **Physiologia Plantarum**, v.109, p.435-442, 2000.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v.161, p.613-619, 2001.

VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G.; JUNIOR, A. R. L.; QUEIROZ, J. E.; Fausto, M. J. M. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.2, p.216-222, 2001.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

YANG, Y. L.; GUO, J. K.; ZHANG, F.; ZHAO, L. Q.; ZHANG, L. X. NaCl induced changes of the H⁺-ATPase in root plasma membrane of two wheat cultivars. **Plant Science**, v.166, p.913-918, 2004.

INTERCAPÍTULO 2

No capítulo 2 foi verificado que para as cultivares Pérola e Pitiúba, a estratégia experimental foi suficiente para determinar discrepâncias, entre ambas, que pudessem classificá-las como resistente e/ou susceptível ao sal no estágio de plântula. Um dos questionamentos que surgiu foi o de saber se apenas uma dose de NaCl não estava mascarando a resposta das duas cultivares. Assim, outras estratégias experimentais foram tomadas para ampliar as discussões em torno dos conceitos de resistência e susceptibilidade nestas cultivares de feijão-caupi.

Nesse sentido, o capítulo seguinte investigou a relação dose de NaCl X comprimento radicular X atividade antioxidante enzimática em raízes de duas cultivares de feijão-caupi através do tratamento com doses crescentes de NaCl .

**RESPOSTAS NO CRESCIMENTO E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE DUAS
CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI EM RELAÇÃO À INTENSIDADE DO
TRATAMENTO SALINO**

3.1. INTRODUÇÃO

A salinidade é um dos principais estresses ambientais (Vaidyanathan *et al.*, 2003). Alguns estudos estimam que 20-50 % de todas as terras agrícolas irrigadas são afetadas pela concentração de sal no solo, resultando em consideráveis perdas econômicas (López-Gómez *et al.*, 2007). A perda no crescimento e desenvolvimento, causada pelo excesso de sal é devida ao déficit hídrico e toxicidade iônica (Marschner, 1995). Em adição ao componente iônico e osmótico, o estresse salino também causa estresse oxidativo. Este ocorre pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Moller *et al.*, 2007). Os níveis celulares de EROs são regulados pela taxa de geração, de reação com substâncias alvo como proteínas lipídeos, e/ou ácidos nucleicos, sua taxa potencial de degradação e a velocidade de remoção/neutralização por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Ben Amor *et al.*, 2005).

Com relação aos mecanismos antioxidantes enzimáticos, várias enzimas estão envolvidas na detoxificação de EROs. Dismutase de superóxido (SOD) (EC 1.15.1.1) converte $\text{O}_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 que, por sua vez, é eliminado por catalases (CAT) (EC 1.11.1.6) e diferentes classes de peroxidases como peroxidases de fenóis (POX) (EC 1.11.1.7) e peroxidases de ascorbato (APX) (EC 1.11.1.1) (Hernández *et al.*, 2001). Dessa forma, a capacidade da planta em eliminar EROs e reduzir seus efeitos danosos sobre macromoléculas parece representar um importante mecanismo de resistência ao estresse (Xiong e Zhu, 2002). Uma relação entre a capacidade de defesa antioxidante e a tolerância ao NaCl foi demonstrada em diversas culturas, como algodão (Gosset *et al.*, 1994), arroz (Dionisio-Sese e Tobita, 1998), ervilha (Hernández *et al.*, 2000) e *Setaria itálica* (Sreenivasulu *et al.*, 2000).

No feijão-caupi foi observado que o padrão de resposta antioxidativa de folhas é diferente daquele observado em raízes de plantas tratadas com NaCl (Cavalcanti *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007). Adicionalmente, os mecanismos de defesa são modificados pelo tratamento salino e estas modificações são dependentes do estágio fisiológico (Grover *et al.*, 1999) e da cultura estudada (capítulo 2).

Entretanto, ainda não se conhece as concentrações de NaCl suportáveis pela espécie, bem como se a resposta antioxidante é dose e cultivar dependente. Para responder a estes questionamentos, este trabalho tem como objetivo determinar a intensidade de danos no crescimento e a resposta enzimática do sistema SOD-CAT-APX-POX de raízes de duas cultivares de feijão-caupi, expostas a diferentes concentrações de NaCl. Adicionalmente, as seguintes hipóteses serão avaliadas: i. o crescimento radicular é afetado pelo estresse salino, mas não apresenta relação com danos oxidativos; ii. a atividade do sistema antioxidante SOD-CAT-APX-POX não é afetada pelo aumento da concentração de NaCl no substrato.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal, condições de cultivo

Para o plantio, as sementes foram desinfetadas pela imersão em solução 0,1 % de hipoclorito de sódio por 5 minutos, seguido de 3 lavagens consecutivas em H₂O deionizada. O semeio foi realizado em papel germinação (dimensões 28 x 38 cm) completamente umedecido com H₂O deionizada (2,5 mL g⁻¹ papel) de acordo com Vieira e Carvalho (1994). Os papéis foram então reunidos formando conjuntos de 4 rolos e envoltos com mais uma folha de papel de germinação embebida em água. Os sistemas foram cobertos por sacos plásticos e mantidos em câmara de crescimento a 27±2 °C, umidade relativa de 80±10 % e fotoperíodo de 12 horas com 240 µmol m⁻² s⁻¹ de radiação luminosa fotossinteticamente ativa.

3.2.2. Tratamento e coleta das plântulas

As etapas de plantio, tratamento e coleta foram adaptadas do capítulo 2 desta tese. Quatro dias após o semeio (DAS) as plantas foram transferidas para os tratamentos que consistiam em rolos de papéis de germinação embebidos com soluções de 0, 25, 50 75 e 100 mM de NaCl, na mesma proporção papel x H₂O utilizada para o plantio. Os conjuntos retornaram às mesmas condições de câmara de crescimento descritas anteriormente. Após dois dias de exposição ao tratamento salino (6º DAS), todas as plântulas foram coletadas. Uma parte do material foi utilizada para determinações de comprimento radicular, conteúdo relativo de água e vazamento de eletrólitos. A outra parte foi congelada, imediatamente, em nitrogênio líquido e conservada a -80 °C para determinação da peroxidação de lipídeos e atividades enzimáticas.

3.2.3. Comprimento radicular, conteúdo relativo de água, teor de Na⁺

O comprimento radicular e conteúdo relativo de água foram realizados conforme item 2.2.3., página 67. As concentrações Na⁺ foram determinadas conforme Viégas *et al.* (2001). Os íons Na⁺ foram extraídos a partir de 50 mg de tecidos secos e pulverizados, em 10 mL de H₂O deionizada. As suspensões foram aquecidas a 100 °C por 1 horas, filtradas e a partir do sobrenadante foram realizadas leituras em fotômetro de chama. Os dados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$.

3.2.4. Danos de membranas e peroxidação de lipídeos

Os danos de membranas e a peroxidação de lipídeos foram realizados conforme o item 2.2.4., página 67.

3.2.5. Atividade de dismutase de superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX) e peroxidase de fenóis (POX)

As atividades de SOD, CAT, APX e POX foram realizadas conforme o item 2.2.5., página 68.

3.2.6. Desenho experimental e análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial 5 x 2 (doses de NaCl x cultivares) e 3 repetições. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3. RESULTADOS

Para determinar a intensidade de danos no crescimento e no padrão de resposta antioxidativa, em raízes de feijão-caupi sob condições de estresse salino, plântulas das cultivares (cv.) Pérola e Pitiúba foram tratadas com 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl. O tratamento salino causou decréscimo significativo no comprimento radicular de ambas as cultivares (Figura 1A). Entretanto, não houve diferenças significativas entre os tratamentos de 25, 50 e 75 mM de NaCl, embora os mesmos difiram significativamente da maior dose (100 mM).

Comparadas aos seus respectivos controles (0 mM), as cv. Pérola e Pitiúba sofreram redução (25 e 56,1 % respectivamente) no comprimento de raízes tratadas com NaCl. O acúmulo de Na^+ no tecido foi proporcional ao aumento da dose de NaCl (Figura 1B). Entre as doses mais elevadas (75 e 100 mM) não houve diferenças significativas em ambas as cultivares. Não houve alteração significativa no CRA de ambas as cultivares (Figura 1C).

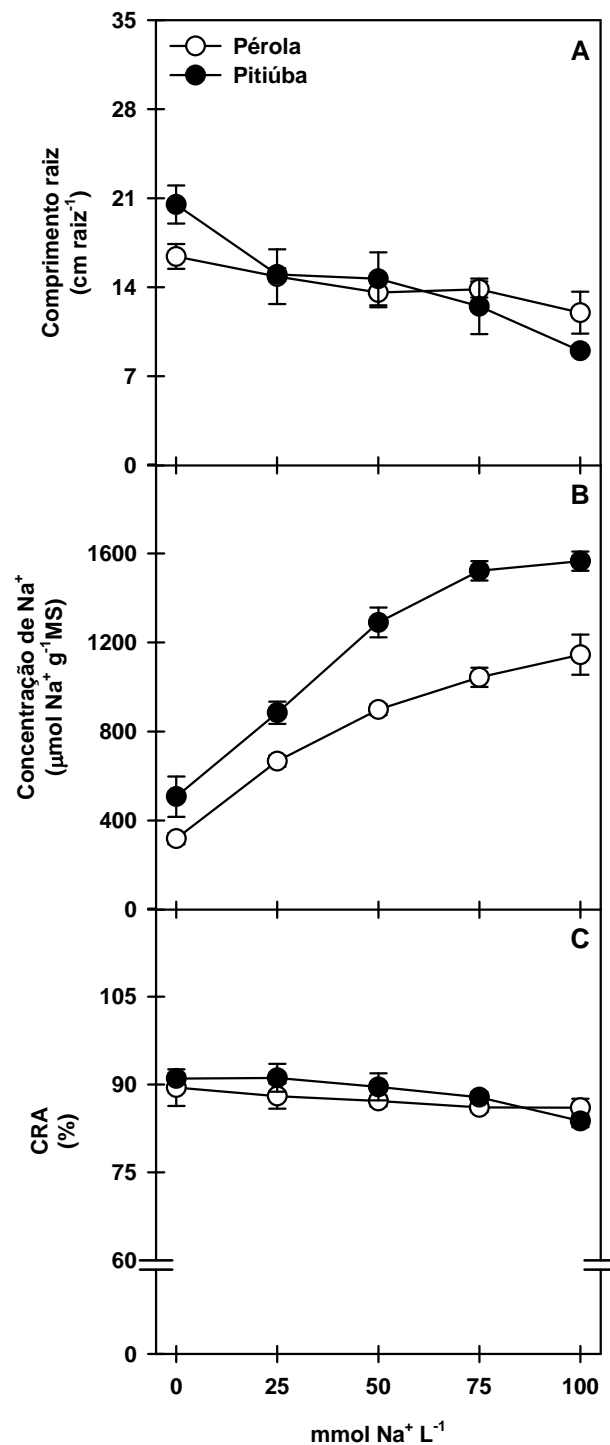


Figura 1 – Comprimento radicular (A), Concentração de Na⁺ (B) e conteúdo relativo de água (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi cv. Pérola e Pitiúba, tratadas com NaCl 0, 25, 50, 75 e 100 mM. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os danos de membranas aumentaram drasticamente com o aumento da dose de NaCl (Figura 2A). Os valores máximos de danos de membrana foram detectados em raízes de ambas as cultivares tratadas com 75 e 100 mM de NaCl. Quanto à peroxidação de lipídeos, esta decresceu discretamente nas duas cultivares (Figura 2B).

Na cv. Pérola, a atividade de SOD não variou significativamente com o aumento da dose de NaCl. Entretanto, na cv. Pitiúba, em presença de 25, 50 e 75 mM de NaCl, a atividade desta enzima apresentou queda de 27,6 % em relação ao controle (Figura 3A). A cv. Pitiúba na ausência de NaCl (0 mM) apresentou atividade de APX 60 % maior que a cv. Pérola sob as mesmas condições. Contudo, observou-se decréscimo médio de 50 % na atividade de APX nas duas cultivares (Figura 3B).

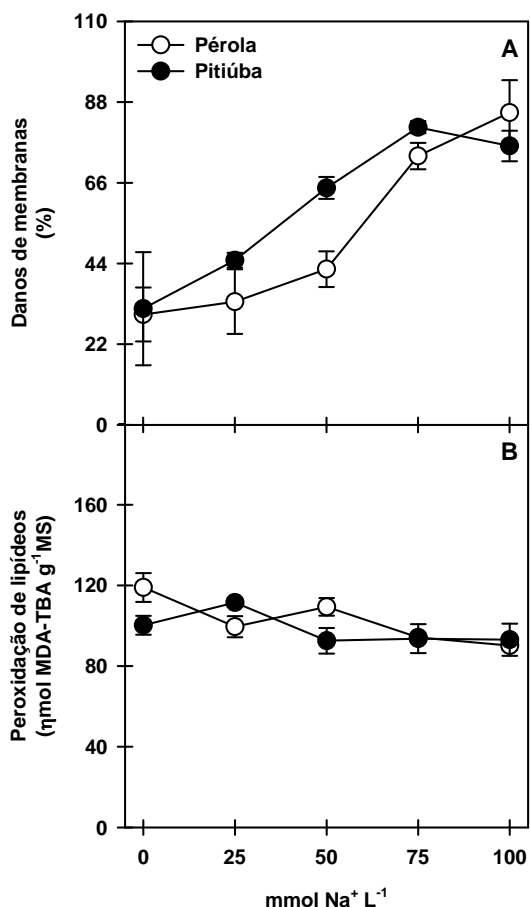


Figura 2 – Vazamento de eletrólitos (A) e peroxidação de lipídeos (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi cv. Pérola e Pitiúba, tratadas com NaCl 0, 25, 50, 75 e 100 mM. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A atividade de CAT também decresceu em ambas as cultivares. Na cv. Pérola a atividade de CAT decresceu até 50 mM (29,3 % em relação ao controle) e se manteve constante entre 50 e 100 mM. Em raízes da cv. Pitiúba houve diminuição drástica na atividade de CAT somente a partir de 75 mM (53 % de 50 a 100 mM) de tratamento com NaCl (Figura 3C). A atividade de POX aumentou em ambas as cultivares proporcionalmente com o aumento da dose de NaCl e este efeito foi marcante nas doses mais elevadas de NaCl (75 e 100 mM) (Figura 3D).

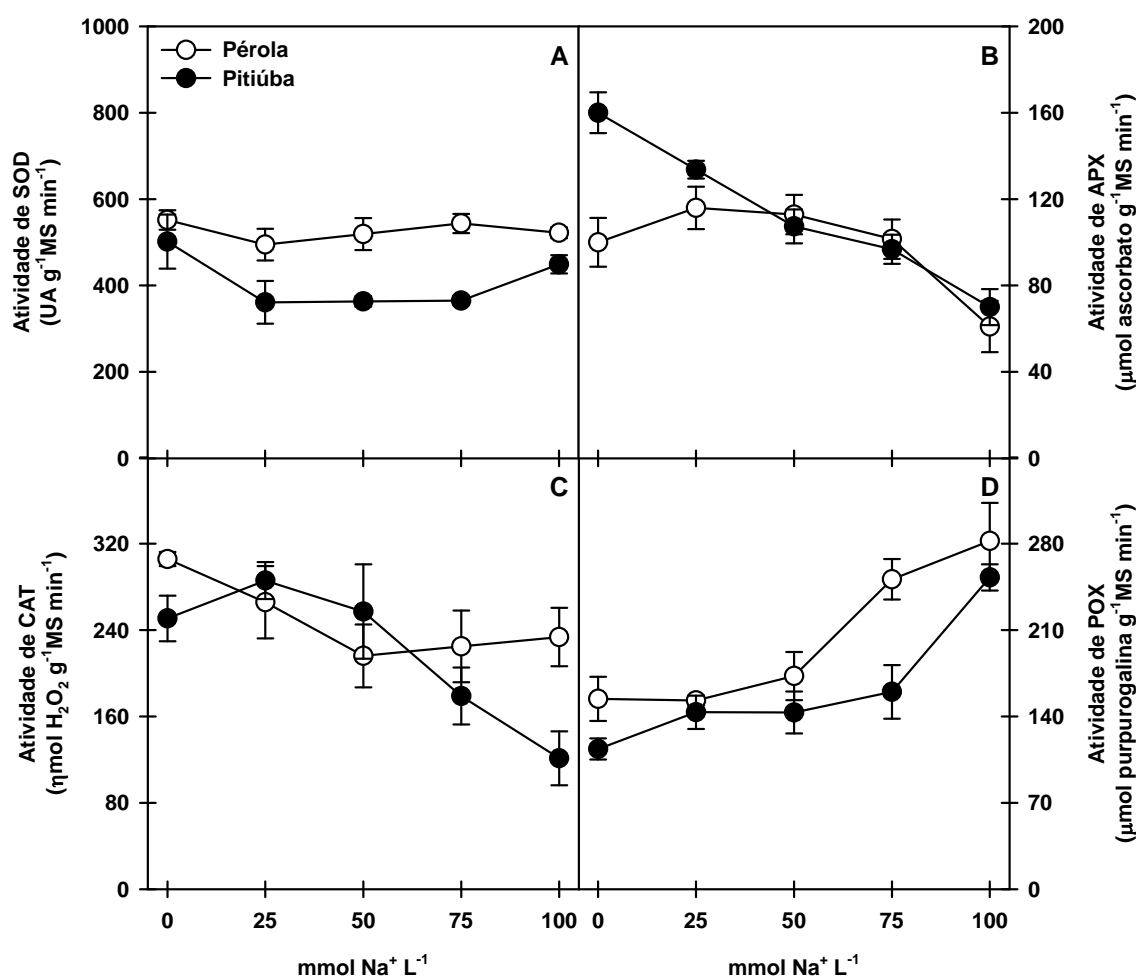


Figura 3 – Atividade de dismutase de superóxido (SOD) (A), peroxidase de ascorbato (APX) (B), catalase (CAT) (C) e peroxidase de fenóis (POX) (D) em raízes de plântulas de feijão-caupi cv. Pérola e Pitiúba, tratadas com NaCl 0, 25, 50, 75 e 100 mM. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4. DISCUSSÃO

Para testar a hipótese de que o crescimento de raízes de feijão-caupi é dependente da cultivar e da dose de NaCl aplicada, foram realizados experimentos aplicando-se 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl em raízes de plântulas das cultivares Pérola e Pitiúba. No 6º dia após o semeio, as plântulas apresentaram redução no comprimento radicular que não foi relacionada ao CRA (Figura 1). Como previamente mostrado no Capítulo 2, a inibição do crescimento pode estar relacionado muito mais com o efeito iônico causado pela concentração de Na^+ nos tecidos, dependente da concentração de NaCl no substrato.

Lin e Kao (2000) descreveram que a inibição no crescimento de folhas e raízes de cereais não é relacionada ao decréscimo de turgor. Este fato reforça a idéia de que embora possa haver estresse osmótico, o efeito iônico é mais danoso. Nesse contexto, a análise da concentração de Na^+ em raízes revela que, em 2 dias de tratamento, as duas cultivares apresentaram tendência de saturação de Na^+ a partir do tratamento com 75 mM de NaCl. Entretanto, a maior relação $\mu\text{mol Na}^+ \text{ g}^{-1}\text{MS}$ na cv. Pitiúba não pode ser considerada como parâmetro determinante da resistência ou sensibilidade desta cultivar.

Evidências mostram que plantas resistentes/tolerantes à salinidade, além da capacidade de excluir o Na^+ do tecido, podem evitar a translocação de Na^+ da raiz para a parte aérea ou, ainda, utilizar esse íon como agente osmótico (Gaxiola *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2002; Cavalcanti *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2007). É importante ressaltar, também, que a estratégia de fixar o tempo de exposição e variar a concentração do NaCl no tratamento indica que a velocidade de acumulação de Na^+ em raiz é dependente da concentração de NaCl utilizada no tratamento.

Com relação aos danos fisiológicos causados pelo tratamento salino, foram mensurados os danos de membranas e peroxidação de lipídeos (Figura 2). Os resultados de danos de membranas indicam que em ambas as cultivares os danos foram máximos a partir do tratamento com 75 mM de NaCl. Vários autores mencionam que o estresse salino pode causar danos severos à integridade de membranas em diversos tecidos de diferentes espécies vegetais (Dionisio-Sese e Tobita, 1998; Hernández *et al.*, 2001; Sudhakar *et al.*, 2001). No caso do feijão-

caupi, esses danos estão muito mais relacionados ao acúmulo de Na^+ nos tecidos (Capítulo 2), reforçando a idéia de que o efeito iônico foi mais acentuado.

A peroxidação de lipídios é outro indicador efetivo de danos oxidativos celulares. Um aumento no índice de peroxidação de lipídeos em plantas estressadas pode indicar extensos danos em membranas celulares, causada por estresse oxidativo (Sairam *et al.*, 2002). Nossos estudos revelam que em raízes de plântulas de feijão-caupi os danos de membranas não estão relacionados aos danos oxidativos observados pela peroxidação de lipídeos. Estes fatos são corroborados pelo trabalho de Cavalcanti *et al.* (2007).

Sugere-se, portanto, que os danos causados em membranas estão relacionados a outros mecanismos de resposta. Dentre eles, o simples aumento da fluidez das membranas e/ou o ataque preferencial de EROs às proteínas de membrana, que permitiriam o extravasamento de moléculas e íons intracelulares (Dionisio-Sese e Tobita, 1998; Yang *et al.*, 2004). Nesse sentido, os resultados de peroxidação de lipídeos sugerem que essa espécie deve ter acionado um sistema antioxidativo eficiente para manter os EROs em níveis aceitáveis nas raízes.

Para testar a hipótese de que a atividade do sistema antioxidante SOD-CAT-APX-POX não é afetada pelo aumento da concentração de NaCl foram determinadas as atividades destas enzimas. Vários autores correlacionam o aumento das atividades dessas enzimas com a resistência de plantas à salinidade (Sreenivasulu *et al.*, 2000; Benavides *et al.*, 2000; Cavalcanti *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007). Hernández *et al.* (1994) reportaram que a atividade catalítica de isoenzimas de SOD de folhas de feijão-caupi diminui em função da concentração de sal *in vitro*. Entretanto, a atividade de SOD da cv. Pérola indica que, nesta cultivar, as concentrações de Na^+ utilizadas não foram suficientes para inibir a atividade de SOD total. Em contrapartida, as condições experimentais foram suficientes para inibir a atividade de SOD na cv. Pitiúba.

Nesse sentido, o elevado conteúdo de íons na raiz em paralelo com o decréscimo na atividade de SOD é consistente com a possibilidade de que o sal possa inibir diretamente a atividade de SOD *in vivo* (Dionisio-Sese e Tobita, 1998). Contudo, esta relação não pode ser generalizada entre espécies e, principalmente,

entre cultivares. Isto se deve ao fato de que diversos estudos revelam que isoformas de SOD são diferencialmente afetadas por estresses abióticos (Bowler *et al.*, 1994; Borsani *et al.*, 2001). Esses estudos induzem a crer que diferenças no comportamento das atividades de SOD das duas cultivares podem estar relacionadas a alterações em diferentes isoformas de SOD em compartimentos subcelulares distintos. Adicionalmente, as cultivares estudadas apresentam sistemas de resposta diferentes e, no caso da cultivar Pitiúba, a resposta é dependente da dose de NaCl aplicada.

Para avaliar a atividade de remoção de H_2O_2 , as atividades das enzimas APX, CAT e POX foram determinadas. Curiosamente, enquanto as atividades de APX e CAT diminuíram com o aumento da dose de NaCl (principalmente a partir de 50 mM), a atividade de POX aumentou, principalmente a partir da dose de 75 mM de NaCl. Desse modo, os resultados sugerem que, em parte, a redução nas atividades de APX e CAT não interfere com a peroxidação de lipídeos. Outras enzimas, portanto, podem atuar como removedoras de EROs em raízes tratadas com NaCl (Mittler, 2002). Dentre elas, as POX de plantas, que são encontradas em vários compartimentos celulares como o citosol, vacúolo, apoplasto e parede celular (Maia, 2004; Mittler *et al.*, 2004). No entanto, ainda não é completamente claro o seu envolvimento na remoção de EROs, já que esta enzima também está envolvida no processo de lignificação e inibição do crescimento em situações de estresse (Cavalcanti *et al.*, 2007). O aumento da atividade de POX proporcional à dose utilizada no tratamento salino poderia, então, equilibrar os níveis de EROs nos diversos compartimentos celulares.

3.5. CONCLUSÕES

O presente estudo permite concluir que a resposta no crescimento e na atividade de enzimas antioxidantes é dose e cultivar dependente. As atividades das enzimas avaliadas respondem, proporcionalmente, até a dose máxima aplicada (100 mM). Assim, é possível que um sistema que envolva a atividade de POX (possivelmente apoplástica) possa estar associado tanto à manutenção dos níveis de H_2O_2 , quanto à redução do comprimento radicular.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAUCHAM.C; FRIDOVIC.I Superoxide Dismutase - Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-8, 1971.
- BEN AMOR, N.; BEN HAMED, K.; DEBEZ, A.; GRIGNON, C.; ABDELLY, C. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. **Plant Science**, v.168, p.889-899, 2005.
- BENAVIDES, M. P.; MARCONI, P. L.; GALLEGGO, S. M.; COMBA, M. E.; TOMARO, M. L. Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.27, p.273-278, 2000.
- BORSANI, O.; DIAZ, P.; AGIUS, M. F.; VALPUESTA, V.; MONZA, J. Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. **Plant Science**, v.161, p.757-763, 2001.
- BOWLER, C.; VANCAMP, W.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide-Dismutase in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.13, p.199-218, 1994.
- CAIRO, P.A.R. **Relações hídricas de plantas. Vitória da Conquista: UESB**, 1995. 32p.
- CAVALCANTI, F. R.; LIMA, J. P. M. S.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.591-600, 2007.
- CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v.163, p.563-571, 2004.
- DIONISIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, v.135, p.1-9, 1998.
- GAO, J. P.; CHAO, D. Y.; LIN, H. X. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: Recent studies on stress response in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.49, p.742-750, 2007.
- GAXIOLA, R. A.; RAO, R.; SHERMAN, A.; GRISAFI, P.; ALPER, S. L.; FINK, G. R. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.1480-1485, 1999.
- GROVER, A.; SAHI, C.; SANAN, N.; GROVER, A. Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. **Plant Science**, v.143, p.101-111, 1999.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts .2. Role of Electron Transfer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.850-&, 1968.

HERNANDEZ, J. A.; DELRIO, L. A.; SEVILLA, F. Salt Stress-Induced Changes in Superoxide-Dismutase Isozymes in Leaves and Mesophyll Protoplasts from *Vigna-Unguiculata* (L) Walp. **New Phytologist**, v.126, p.37-44, 1994.

HERNANDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMENEZ, A.; BARCELO, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O₂(-)/H₂O₂ 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.

HERNANDEZ, J. A.; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. **Plant Cell and Environment**, v.23, p.853-862, 2000.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.

LIN, C. C.; KAO, C. H. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.30, p.151-155, 2000.

LOPEZ-GOMEZ, E.; SAN JUAN, M. A.; DIAZ-VIVANCOS, P.; BENEYTO, J. M.; GARCIA-LEGAZ, M. F.; HERNANDEZ, J. A. Effect of rootstocks grafting and boron on the antioxidant systems and salinity tolerance of loquat plants (*Eriobotrya japonica* Lindl.). **Environmental and Experimental Botany**, v.60, p.151-158, 2007.

MAATHUIS, F. J. M.; AMTMANN, A. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. **Annals of Botany**, v.84, p.123-133, 1999.

MAIA, J. M. **Efeitos aditivos e interativos de tratamentos de seca e NaCl na resposta antioxidativa de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)].** (Dissertação de Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE., 2004. 129 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**, London: Academic Press, 2^o ed., 1995.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

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

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

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.

SAIRAM, R. K.; RAO, K. V.; SRIVASTAVA, G. C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, v.163, p.1037-1046, 2002.

SHI, H. Z.; QUINTERO, F. J.; PARDO, J. M.; ZHU, J. K. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. **Plant Cell**, v.14, p.465-477, 2002.

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGO, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.45-56, 2004.

SREENIVASULU, N.; GRIMM, B.; WOBUS, U.; WESCHKE, W. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). **Physiologia Plantarum**, v.109, p.435-442, 2000.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v.161, p.613-619, 2001.

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.

VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G.; JUNIOR, A. R. L.; QUEIROZ, J. E.; Fausto, M. J. M. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.2, p.216-222, 2001.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

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.

YANG, Y. L.; GUO, J. K.; ZHANG, F.; ZHAO, L. Q.; ZHANG, L. X. NaCl induced changes of the H⁺-ATPase in root plasma membrane of two wheat cultivars. **Plant Science**, v.166, p.913-918, 2004.

INTERCAPÍTULO 3

As análises apresentadas no capítulo 3 foram capazes de determinar que a resposta no crescimento, e na atividade de enzimas antioxidantes é dose e cultivar dependente. Contudo, surgiram evidências de que a atividade de peroxidase de fenóis possa estar associada tanto à manutenção dos níveis de H_2O_2 quanto à redução do comprimento radicular.

Assim, o capítulo seguinte tratou de estudar os mesmos parâmetros do capítulo anterior, agora em uma análise temporal da exposição ao NaCl. As doses de 50 e 100 mM de NaCl foram selecionadas como tratamento moderado e severo, respectivamente, através da análise dos resultados do capítulo 3. Como modelo de estudo, foi utilizado somente a cultivar Pitiúba. Esta escolha foi motivada pelo potencial desta cultivar em apresentar resultados contrastantes entre os controles e tratamentos, principalmente nas respostas das enzimas antioxidantes.

**RESPOSTAS NO CRESCIMENTO E ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RAÍZES
DE FEIJÃO-CAUPI EM RELAÇÃO AO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO NaCl**

CAPÍTULO 4

4.1. INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes fatores limitantes da produtividade de plantas é o estresse salino, presente especialmente em regiões áridas e semi-áridas, como no nordeste do Brasil (Souza *et al.*, 2004). A baixa precipitação pluviométrica, a alta evapotranspiração e altas temperaturas associadas com o manejo irregular da água e do solo tornam a salinidade um problema de grande importância para a produção agrícola nestas regiões (Neto *et al.*, 2006).

Os vegetais possuem diversas estratégias bioquímicas e fisiológicas de tolerância/resistência. Essas estimulam as respostas, através de alterações celulares que interferem no metabolismo de tecidos, assim como do organismo como um todo (Munns e Tester, 2008). Plantas tolerantes à salinidade são geralmente estudadas em relação aos mecanismos regulatórios da homeostase iônica e osmótica (Apel e Hirt, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007; Munns e Tester, 2008). Entretanto, o estresse salino também causa estresse oxidativo aumentando o “pool” de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Moller *et al.*, 2007).

Os EROs podem alterar o metabolismo através de danos oxidativos em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Neto *et al.*, 2006). Esses danos podem ser controlados por um complexo sistema antioxidante incluindo antioxidantes de massa molecular reduzida, bem como enzimas antioxidantes como a dismutases de superóxido (SOD), catalases (CAT), peroxidases de ascorbato (APX) e peroxidases de fenóis (POX) (Hernández *et al.* 2001). A avaliação da estabilidade de membranas também é amplamente utilizada para diferenciar cultivares sensíveis e resistentes ao tratamento salino (Dionisio-Sese e Tobita, 1998; Luna *et al.*, 2000; Shalata *et al.*, 2001; Hernández e Almansa, 2002). Algumas evidências sugerem que a resistência ao estresse oxidativo pode, pelo menos em parte, ser envolvida na tolerância ao NaCl (Hernández *et al.*, 2000).

O feijão-caupi, uma espécie amplamente cultivada no nordeste brasileiro é adaptado a vários estresses abióticos como a seca, salinidade, altos níveis de

temperatura e radiação, as quais, isoladas ou em combinação, podem induzir danos oxidativos em plantas (Foyer e Noctor, 2000). Diferentes estudos mostram que o feijão-caupi, sob condições de salinidade, pode modular a resposta antioxidante (Cavalcanti *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007; Maia, 2004). Contudo, alguns questionamentos acerca dos mecanismos antioxidantes desta espécie ainda permanecem em aberto: i. qual a relação entre o crescimento e a concentração de NaCl no solo?; ii. como o tempo de exposição ao tratamento salino pode influenciar no desenvolvimento da resposta antioxidativa e no crescimento?; iii. qual a relação fisiológica entre o nível de NaCl e o tempo de exposição ao tratamento?

Na intenção de contribuir com a resposta a esses questionamentos, o presente estudo avaliou alguns parâmetros de crescimento e resposta antioxidante em raízes de feijão-caupi tratadas com níveis moderados e severos de NaCl e expostas a diferentes intervalos de tempo ao estresse. Este trabalho pretende testar a hipótese de que o crescimento da raiz é afetado pelo tempo de exposição aos tratamentos salinos. Adicionalmente, será verificado se os efeitos, no crescimento, do tempo de exposição ao tratamento salino estão relacionados ao estresse oxidativo.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal, condições de cultivo

Sementes de feijão-caupi cv. Pitiúba foram desinfetadas pela imersão em solução 0,1 % de hipoclorito de sódio por 5 minutos, seguido de 3 lavagens consecutivas em H₂O deionizada. O semeio foi realizado em papel germinação (dimensões 28 x 38 cm) completamente umedecido com H₂O deionizada (2,5 mL g⁻¹ papel) de acordo com Vieira e Carvalho (1994). Os papéis foram então enrolados e reunidos formando conjuntos de 4 rolos e envoltos com mais uma folha de papel de germinação embebida em água. Os sistemas foram cobertos por sacos plásticos e mantidos em câmara de crescimento a 27±2 °C, umidade relativa de 80±10 % e fotoperíodo de 12 horas com 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação luminosa fotossinteticamente ativa.

4.2.2. Tratamento e coleta das plântulas

As doses utilizadas para esse experimento foram selecionadas a partir do capítulo 3 desta tese na intenção de tratar o modelo vegetal com 3 doses de NaCl (controle, moderada e severa). No 4º dias após o semeio (DAS) as plantas foram transferidas para o tratamentos, consistindo de rolos de papéis de germinação embebidos com soluções de 0, 50 (moderada) e 100 mM (severa) de NaCl, na mesma proporção papel x H₂O utilizada para o plantio. Os conjuntos retornaram às mesmas condições de câmara de crescimento descritas anteriormente. As raízes das plântulas foram coletadas nos tempos 0; 24; 48; 72 e 96 horas após o plantio. Uma parte do material foi utilizada para determinações de comprimento radicular, conteúdo relativo de água e vazamento de eletrólitos. A outra parte foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e conservada a -80 °C para determinação da peroxidação de lipídeos e atividades enzimáticas.

4.2.3. Comprimento radicular, conteúdo relativo de água, teor de Na⁺

O comprimento radicular e conteúdo relativo de água foram realizados conforme item 2.2.3., página 67. A concentração de Na⁺ foi mensurada de acordo como metodologia descrita no item 3.2.3., página 88.

4.2.4. Danos de membranas e peroxidação de lipídeos

Os danos de membrana e a peroxidação de lipídeos foi avaliada conforme item 2.2.4., página 67.

4.2.5. Atividade de dismutase de superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX) e peroxidase de fenóis (POX)

As atividades de SOD, CAT, APX e POX foram analisadas conforme item 2.2.5., página 68.

4.2.6. Desenho experimental e análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial 3 x 5 x 1 (doses de NaCl x tempos x cultivar) e 3 repetições. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.3. RESULTADOS

Para determinar a resposta antioxidante e de crescimento em raízes de feijão-caupi tratadas com níveis moderados e severos de NaCl, raízes de plântulas da cultivar (cv.) Pitiúba foram tratadas com NaCl 50 e 100 mM durante 0; 24; 48; 72 e 96 horas. O comprimento radicular foi afetado somente após 48 horas de exposição ao tratamento salino. Na presença de 100 mM de NaCl o crescimento radicular foi inibido, enquanto que na dose moderada (50 mM), o crescimento foi próximo ao do controle (Figura 1A). O acúmulo de Na⁺ foi proporcional ao tempo de exposição e para cada dose de NaCl utilizada no experimento (Figura 1B). Nas raízes tratadas com 100 mM de NaCl, o conteúdo relativo de água e a peroxidação de lipídeos não foram significativamente alterados em nenhuma das doses ao longo do tempo de exposição ao NaCl (Figura 1C e 2B).

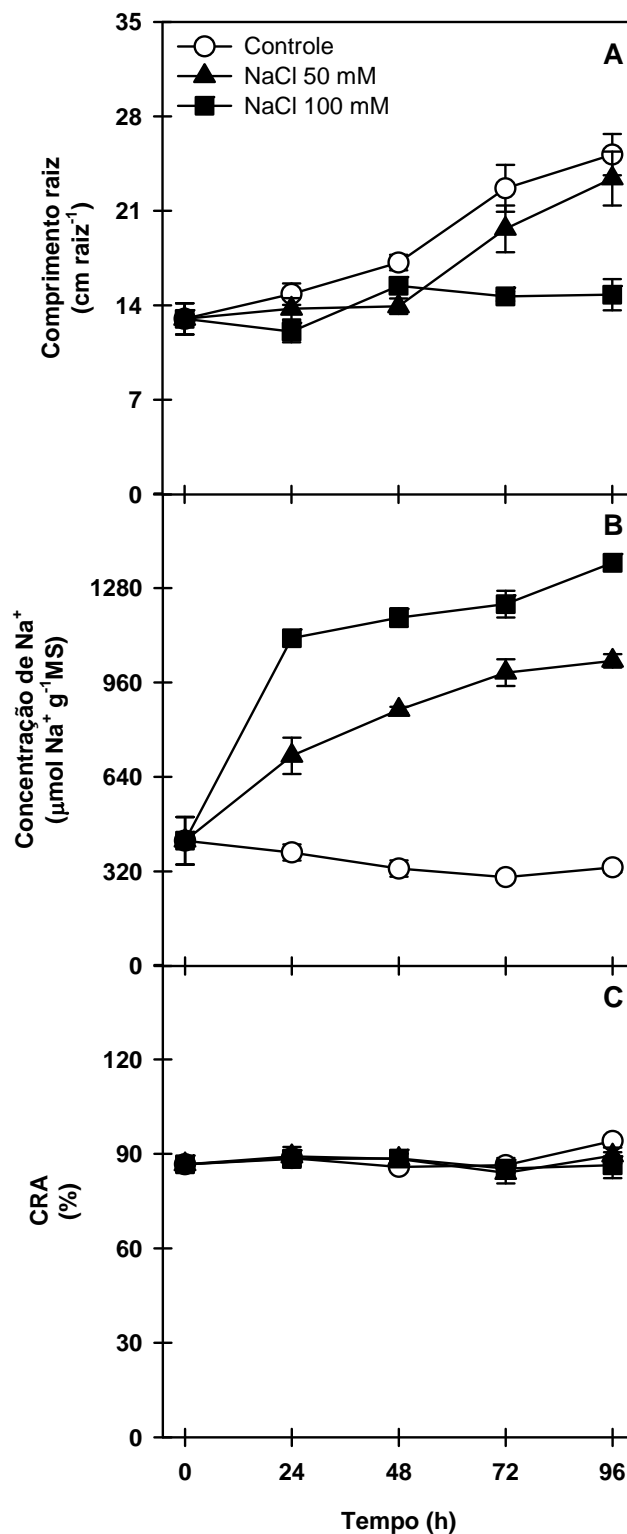


Figura 1 – Comprimento radicular (A), concentração de Na⁺ (B) e conteúdo relativo de água (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cv. Pitiúba, submetidas a doses de 0 mM – controle, 50 e 100 mM de NaCl, durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Danos de membranas foram detectados logo nas primeiras 24 horas de exposição aos tratamentos de 50 e 100 mM de NaCl (Figura 2A). O tratamento com 50 mM de NaCl causou aumento de 55,8 % nos danos de membranas nas primeiras 24 horas. Após 48 horas, houve decréscimo gradual alcançando o valor mínimo de 40,76% de danos após 96 horas de exposição ao tratamento.

A atividade de SOD aumentou em todos os tratamentos ao longo das 96 horas, havendo diferenças significativas entre o controle e os demais tratamentos (Figura 3A). A atividade de APX foi afetada somente pelo tratamento com 100 mM de NaCl (Figura 3B). Este tratamento causou decréscimo de 68 % na atividade desta enzima após 48 horas.

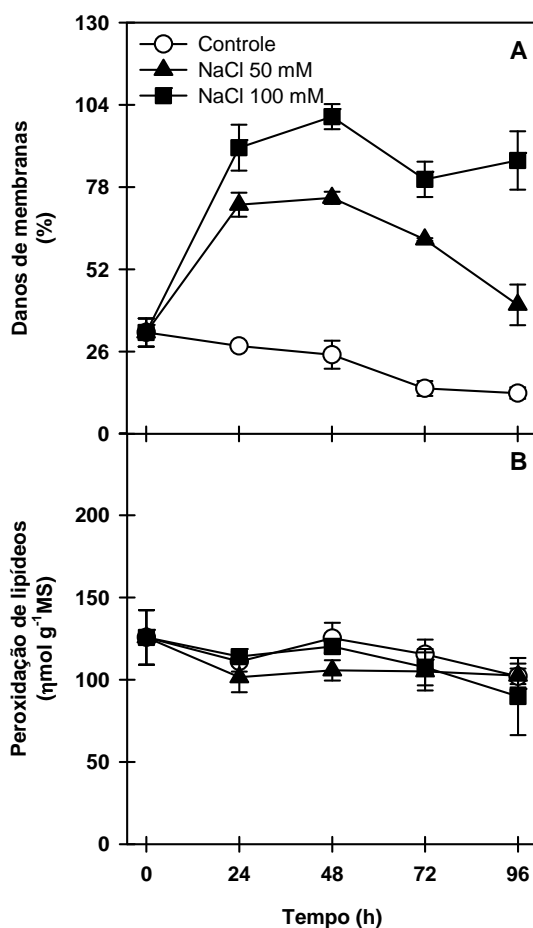


Figura 2 – Vazamento de eletrólitos (A) e peroxidação de lipídeos (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cv. Pitiúba, submetidas a doses de 0 mM – controle, 50 e 100 mM de NaCl, durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A atividade de CAT apresentou diferenças significativas somente após 48 horas de tratamento, sendo reduzida, drasticamente, pelos tratamentos com NaCl 50 e 100 mM (Figura 3C).

Quando comparado ao controle, em 96 horas, as doses de NaCl 50 e 100 mM causaram decréscimo de até 62,7 % na atividade desta enzima. A atividade de POX foi estimulada pelas duas doses de NaCl, sendo este efeito mais marcante na dose mais elevada (100 mM) e após 24 horas de tratamento. O aumento da atividade de POX em raízes tratadas com 50 mM de NaCl foi observado somente após 72 horas de exposição (Figura 3D).

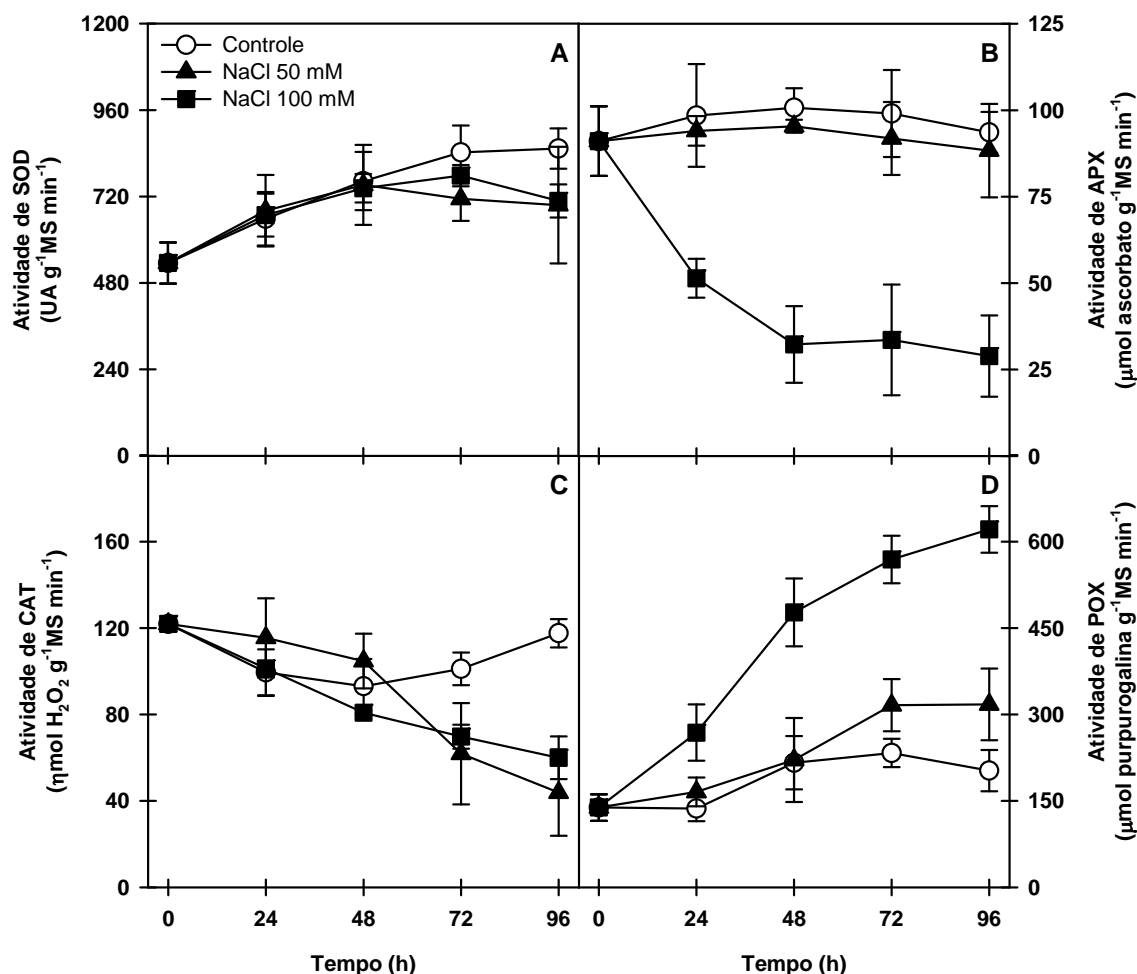


Figura 3 – Atividade enzimática de dismutase de superóxido (SOD) (A), peroxidase de ascorbato (APX) (B), catalase (CAT) (C) e peroxidase de fenóis (POX) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cv. Pitiúba, submetidas doses de 0 mM – controle, 50 e 100 mM de NaCl, durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4. DISCUSSÃO

Para testar a hipótese de que o crescimento da raiz é afetado pelo tempo de exposição aos tratamentos salinos, plântulas de feijão-caupi, cv. Pitiúba foram tratadas com NaCl 50 e 100 mM durante 0; 24; 48; 72 e 96 horas. Nos capítulos 2 e 3 foi sugerido que a diminuição no comprimento radicular pode estar relacionado à toxicidade de íons Na^+ nos tecidos radiculares. Essa observação é reforçada pela velocidade de acumulação de Na^+ em raízes tratadas com a dose moderada (50 mM de NaCl) e severa (100 mM de NaCl). Enquanto o tratamento moderado causou a saturação dos tecidos somente após 72 horas de exposição ao NaCl, o tratamento severo causou a elevação drástica da concentração de Na^+ em 24 horas que continuou aumentando até 96 horas.

A acumulação dos íons Na^+ refletiu no comprimento radicular, ou seja, o tratamento moderado não interferiu significativamente no comprimento, enquanto que a saturação dos tecidos, em apenas 24 horas de tratamento (severo), causou a inibição total do comprimento radicular. Corroborando os resultados do capítulo 2 e 3, esse decréscimo no comprimento da raiz não é reflexo do CRA, o que reforça a idéia de que não houve estresse osmótico aparente em raízes sob as condições experimentais impostas.

A hipótese de que os efeitos no crescimento em função do tempo de exposição ao tratamento salino estão relacionados ao estresse oxidativo foi testada pelos ensaios de danos de membranas e peroxidação de lipídeos. Os resultados de danos de membranas indicam que o tratamento de NaCl moderado induziu danos moderados e que, aparentemente, as raízes apresentaram a recuperação até as 96 horas. Contrariamente, os danos de membrana causados pelo tratamento NaCl severo causou danos irreversíveis.

Vários autores mencionam que o estresse salino pode causar danos severos à integridade de membranas em diversos tecidos de diferentes espécies vegetais (Dionisio-Sese e Tobita, 1998; Hernández *et al.*, 2001; Sudhakar *et al.*, 2001). Contudo, o tratamento moderado estimulou a absorção de Na^+ mais lenta que no tratamento severo (capítulo 3). Essa estratégia possivelmente foi crucial para

diferenciar entre o comportamento de crescimento das plântulas tratadas com 50 e 100 mM de NaCl. De fato, a recuperação de raízes tratadas com NaCl moderado (em 72 e 96 horas), pode estar integralmente associada ao crescimento radicular que aumentou somente em 72 e 96 horas, bem como à velocidade de absorção de Na⁺ entre 48 e 72 horas (116,79 $\mu\text{mol Na}^+ \text{ g}^{-1}\text{MS dia}^{-1}$) e 72 e 96 horas (40,24 $\mu\text{mol Na}^+ \text{ g}^{-1}\text{MS dia}^{-1}$).

A peroxidação de lipídios é outro indicador efetivo de danos oxidativos celulares. O aumento no índice de peroxidação de lipídeos em plantas estressadas pode indicar extensos danos em membranas celulares, causada por estresse oxidativo (Sairam *et al.*, 2002). Nossos estudos revelam que em raízes de plântulas de feijão-caupi os danos de membranas não estão relacionados aos danos oxidativos observados pela peroxidação de lipídeos. Estes fatos corroboram o trabalho de Cavalcanti *et al.* (2007).

Sugere-se, portanto, que os danos causados em membranas podem ou não estar relacionados ao aumento da fluidez das membranas e/ou ao ataque preferencial de EROs às proteínas de membrana (Dionisio-Sese e Tobita, 1998; Yang *et al.*, 2004). Tais observações já foram colocadas em evidência em estudos realizados em arroz (Vaidyanathan *et al.*, 2003; Demiral e Türkan, 2005), milho (Neto *et al.*, 2006) e feijão-caupi (Cavalcanti *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007). Os resultados mostram que o grau de severidade dos efeitos do NaCl no crescimento radicular e nas membranas, bem como no acúmulo de Na⁺ nos tecidos está diretamente associada à dose de NaCl, bem como ao tempo de exposição ao sal.

A atividade do sistema enzimático SOD-CAT-APX-POX também foi testada. Vários autores correlacionam o aumento da atividade dessas enzimas com a resistência de plantas à salinidade (Hernandez *et al.*, 1995; Sreenivasulu *et al.*, 2000; Benavides *et al.*, 2000; Cavalcanti *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007). A atividade de SOD não alterou significativamente pelo tratamento ao longo das 96 horas de exposição ao NaCl. Contudo, não foi confirmado se houve mudanças em isoformas específicas desta enzima.

Segundo Dionisio-Sese e Tobita (1998), o excesso de íons na raiz, em paralelo ao decréscimo na atividade de SOD, é consistente com a possibilidade de

que o sal possa inibir diretamente a atividade de SOD *in vivo*. Contudo, esta relação não pode ser generalizada visto que diversos estudos revelam que isoformas de SOD são diferencialmente afetadas por estresses abióticos (Bowler *et al.*, 1994; Borsani *et al.*, 2001). Esses estudos indicam que, embora a atividade global não tenha sido afetada, mudanças na atividade de isoformas em compartimentos subcelulares podem ocorrer. Entretanto, estudos posteriores precisam ser realizados em diferentes compartimentos subcelulares como apoplasto, citosol, peroxissomos e mitocôndrias para verificar se atividade dessas isoformas são efetivamente alteradas pelo estresse salino.

Para avaliar a atividade de remoção de H₂O₂, as atividades das enzimas APX, CAT e POX foram avaliadas. A atividade de APX, não foi reduzida pelo tratamento com 50 mM. Em contrapartida, o tratamento com NaCl 100 mM causou redução drástica na atividade desta enzima, em apenas 48 horas. Aparentemente, a atividade de APX é modulada pela dose de NaCl, assim como pelo tempo de exposição. Contrariamente, a resposta da CAT ao estresse salino parece não ser dose- nem tempo-dependente.

O tratamento salino aumentou a atividade da POX, sendo esta resposta modulada pela dose e pelo tempo de exposição ao NaCl. Segundo Dionísio-Sese e Tobita (1998), no arroz, o aumento na atividade de POX está diretamente relacionada à redução na taxa de crescimento de raízes. De acordo com os mesmo autores, essa enzima participa da formação de hemiceluloses e insolubilização de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, no ambiente apoplástico, causando endurecimento da parede celular. Outros autores sugerem que o NaCl possa promover aumento na atividade dessa enzima através da superexpressão de genes que codificam peroxidases (síntese *de novo*; Mittal e Dubey, 1991), ou ainda por ativação de isoformas previamente sintetizadas (Gosset *et al.*, 1994; Dionisio-Sese e Tobita, 1998; Sudhakar *et al.*, 2001; Lin e Kao, 2002).

Os resultados apresentados sugerem que a atividade de POX e o crescimento radicular de plantas de feijão-caupi estressadas com NaCl apresentaram correlação negativa, ou seja, quando a atividade de POX aumenta durante o tratamento salino, o comprimento radicular diminui. Nesse sentido, é possível que a

POX possa estar envolvida muito mais com a redução no comprimento da raiz de feijão-caupi, estressado com NaCl, do que na proteção dos tecidos contra danos oxidativos causados por EROs. Contudo, nenhuma das alternativas pode ser excluída. Em contraste à atividade de POX, a atividade de CAT foi drasticamente reduzida em plantas tratadas. A redução na atividade de CAT indica que o estresse induzido pelo NaCl, de alguma forma, causa efeitos estruturais ou funcionais diretos na proteína CAT.

Foyer e Noctor (2000) sugerem que o estresse salino pode provocar a degradação de CAT por proteases endógenas. Em outro ponto de vista, a inibição da atividade de CAT é um fenômeno que ocorre em muitas espécies vegetais expostas ao estresse oxidativo e, possivelmente, está relacionada à acumulação de ácido salicílico (Shim *et al.*, 2003). De todo modo, maiores esclarecimentos ainda são necessários para desvendar os processos que provocam diminuição da atividade de CAT.

Palatnik *et al.* (2002), estudando a atividade de enzimas antioxidantes em plantas mutantes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) deficientes em catalase, identificaram que a interação entre APX e CAT revela que esse sistema antioxidante encontra novo equilíbrio no ambiente celular de mutantes deficientes de catalase. Nesse cenário, a manutenção da atividade de APX no tratamento com NaCl moderado fornece uma via alternativa para eliminar H₂O₂ quando os níveis de CAT são criticamente baixos. Baseado nessas observações fica claro que o equilíbrio entre as atividades de CAT e APX exibe forte e complexa interação em células vegetais (Palatnik *et al.*, 2002).

Nos resultados apresentados, a redução drástica na atividade de CAT e o aumento da atividade de POX indicam que, dentre as enzimas estudadas, as peroxidases, possivelmente, participam ativamente da via de eliminação de EROs, quando a atividade de CAT é reduzida (Sudhakar *et al.*, 2001). Assim, a ausência de danos oxidativos baseados no índice de peroxidação de lipídeos, pode estar relacionada à resposta do sistema antioxidante enzimático.

4.5. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a redução no comprimento radicular, bem como os danos de membrana causados pelo estresse salino, depende da dose e do tempo de exposição ao NaCl e que tais efeitos são acompanhados pelo acúmulo de Na⁺ nos tecidos, embora tal acúmulo não leve à peroxidação de lipídeos. Adicionalmente, a atividade de SOD, CAT e APX não estão envolvidas na remoção de EROs. Contudo, a POX pode exercer uma remoção de EROs e/ou agir indiretamente na redução do crescimento radicular.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.

BEAUCHAM.C; FRIDOVIC.I Superoxide Dismutase - Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-8, 1971.

BENAVIDES, M. P.; MARCONI, P. L.; GALLEGOS, S. M.; COMBA, M. E.; TOMARO, M. L. Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.27, p.273-278, 2000.

BORSANI, O.; DIAZ, P.; AGIUS, M. F.; VALPUESTA, V.; MONZA, J. Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. **Plant Science**, v.161, p.757-763, 2001.

BOWLER, C.; VANCAMP, W.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide-Dismutase in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.13, p.199-218, 1994.

CAIRO, P.A.R. **Relações hídricas de plantas. Vitória da Conquista: UESB**, 1995. 32p.

CAVALCANTI, F. R.; LIMA, J. P. M. S.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.591-600, 2007.

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v.163, p.563-571, 2004.

DEMIRAL, T.; TURKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v.53, p.247-257, 2005.

DIONISIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, v.135, p.1-9, 1998.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, v.146, p.359-388, 2000.

GOSSETT, D. R.; MILLHOLLON, E. P.; LUCAS, M. C. Antioxidant Response to NaCl Stress in Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Cultivars of Cotton. **Crop Science**, v.34, p.706-714, 1994.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts .2. Role of Electron Transfer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.850-&, 1968.

HERNANDEZ, J. A.; ALMANSA, M. S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.251-257, 2002.

HERNANDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMENEZ, A.; BARCELO, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ 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.

HERNANDEZ, J. A.; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. **Plant Cell and Environment**, v.23, p.853-862, 2000.

HERNANDEZ, J. A.; OLMOS, E.; CORPAS, F. J.; SEVILLA, F.; DELRIO, L. A. Salt-Induced Oxidative Stress in Chloroplasts of Pea-Plants. **Plant Science**, v.105, p.151-167, 1995.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.

LIN, C. C.; KAO, C. H. Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.37, p.177-183, 2002.

LUNA, C.; SEFFINO, L. G.; ARIAS, C.; TALEISNIK, E. Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. **Plant Breeding**, v.119, p.341-345, 2000.

MITTAL, R.; DUBEY, R. S. Behavior of Peroxidases in Rice - Changes in Enzyme-Activity and Isoforms in Relation to Salt Tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.29, p.31-40, 1991.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

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.

NETO, A. D. D.; PRISCO, J. T.; ENEAS, J.; DE ABREU, C. E. B.; GOMES, 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.

PALATNIK, J. F.; VALLE, E. M.; FEDERICO, M. L.; GOMEZ, L. D.; MELCHIORRE, M. N.; PALEO, A. D.; CARRILLO, N.; ACEVEDO, A. Status of antioxidant metabolites and enzymes in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, v.162, p.363-371, 2002.

REN, H. X.; WANG, Z. L.; CHEN, X.; ZHU, Y. L. Antioxidative responses to different altitudes in *Plantago major*. **Environmental and Experimental Botany**, v.42, p.51-59, 1999.

SAIRAM, R. K.; RAO, K. V.; SRIVASTAVA, G. C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, v.163, p.1037-1046, 2002.

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.

SHIM, I. S.; MOMOSE, Y.; YAMAMOTO, A.; KIM, D. W.; USUI, K. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.285-292, 2003.

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGOA, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.45-56, 2004.

SREENIVASULU, N.; GRIMM, B.; WOBUS, U.; WESCHKE, W. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). **Physiologia Plantarum**, v.109, p.435-442, 2000.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v.161, p.613-619, 2001.

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.

VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G.; JUNIOR, A. R. L.; QUEIROZ, J. E.; Fausto, M. J. M. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.2, p.216-222, 2001.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

YANG, Y. L.; GUO, J. K.; ZHANG, F.; ZHAO, L. Q.; ZHANG, L. X. NaCl induced changes of the H⁺-ATPase in root plasma membrane of two wheat cultivars. **Plant Science**, v.166, p.913-918, 2004.

INTERCAPÍTULO 4

O capítulo 4 demonstrou que os parâmetros fisiológicos e enzimáticos analisados podem ser afetados pelo tempo e pela dose de NaCl imposta às plantas. Adicionalmente, foi possível entender que a atividade de dismutase de superóxido (SOD), peroxidase de ascorbato (APX) e catalase (CAT) podem não estar envolvidas na defesa antioxidante e que a peroxidase de fenóis (POX) pode ser capaz de compensar a diminuição da atividade de APX e CAT, contribuindo em algum grau para a diminuição do crescimento radicular e/ou remoção das espécies reativas de oxigênio.

Para contribuir com a elucidação desses mecanismos e compreender como as peroxidases de fenóis podem participar no controle de crescimento, o capítulo seguinte envolveu pelo menos 3 experimentos. Estes relacionaram o metabolismo das espécies reativas de oxigênio de apoplasto, com mecanismos possivelmente envolvidos com o controle do crescimento.

**METABOLISMO OXIDATIVO EM APOPLASTO E REGULAÇÃO DO
CRESCIMENTO DE RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPI EXPOSTO AO ESTRESSE
SALINO**

5.1. INTRODUÇÃO

Nas plantas, um dos efeitos mais marcantes da salinidade é a redução na taxa de crescimento causada primariamente por um desequilíbrio iônico e osmótico (Lin e Kao, 2002). Entretanto, o estresse salino também causa estresse oxidativo pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Moller *et al.*, 2007). Os EROs podem alterar o metabolismo celular e provocar danos oxidativos em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Neto *et al.*, 2006). Esses podem ser controlados por um complexo sistema antioxidativo que inclui componentes não enzimáticos, bem como enzimas antioxidantes como a dismutase de superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX) e peroxidase de fenóis (POX) (Hernández *et al.*, 2001).

Alguns autores relacionam o fenômeno de diminuição da taxa de crescimento com processos que envolvem mecanismos antioxidantes (Foreman *et al.*, 2003; De Cnodder *et al.*, 2005; Foyer e Noctor, 2005; Carol e Dolan, 2006). Foyer e Noctor (2005) descrevem que a diminuição do crescimento precede a uma explosão oxidativa. O compartimento celular onde primeiro ocorre a explosão oxidativa ainda é controverso (Qin *et al.*, 2004). Entretanto, atualmente, a hipótese mais aceita é que seja no apoplasto, envolvendo uma oxidase de NADPH (NOX - EC 1.6.3.1) que transfere elétrons do NADPH citoplasmático para O_2 apoplástico, formando $\text{O}_2^{\bullet-}$, sendo este então dismutado a H_2O_2 (Ogawa *et al.*, 1996; Qin *et al.*, 2004; Passardi *et al.*, 2004; Foyer e Noctor, 2005).

Acredita-se que a liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 no apoplasto contribui para várias estratégias de resistência de plantas, como a resposta hipersensitiva e a síntese de barreiras defensivas como a parede celular (Sgherri *et al.*, 2007). Passardi *et al.*, (2004) relata que a redução na taxa de crescimento está estritamente relacionada com o balanço entre atividades de diferentes isoformas de POX, as quais podem restringir ou promover o crescimento do tecido. A restrição é causada por isoformas que usam o H_2O_2 como um oxidante gerando radicais fenoxi-monolignóis

que se acoplam espontaneamente um nos outros para a formação de lignina polimerizada.

Por outro lado, o crescimento é promovido por peroxidases que formam radicais HO^\bullet e HOO^\bullet (peroxidrilas) a partir de H_2O_2 . Estes radicais são responsáveis pela clivagem de vários polissacarídeos como pectinas e xiloglicanas, causando um “afrouxamento” da parede celular, permitindo o crescimento (Schweikert *et al.*, 2000; Passardi *et al.*, 2004). O ascorbato é envolvido no controle desses processos por contribuir com a produção de HO^\bullet utilizando H_2O_2 . Esse processo induz a retomada do crescimento através do desvio do “pool” de H_2O_2 , que inicialmente era utilizado pela POX apoplástica para a lignificação (Passardi *et al.*, 2004).

Em feijão-caupi, é possível que a atividade de POX esteja relacionada com a redução no comprimento de raízes tratadas com NaCl (capítulo 3 e 4). Entretanto, ainda não é completamente claro como a via de remoção de EROs apoplástica está envolvida na redução da taxa de crescimento em plantas sobre condições de estresses abióticos (Minibaeva e Gordon, 2003; Carol e Dolan, 2006; Sgherri *et al.*, 2007), principalmente o estresse salino (Cavalcanti *et al.*, 2004).

Assim, este estudo pretende determinar a relação entre a via metabólica de EROs apoplástico com o crescimento de raízes de plântulas de feijão-caupi expostas à salinidade. Este trabalho pretende testar a hipótese de que o tratamento salino causa diminuição no comprimento radicular, através da indução de mecanismos metabólicos de defesa antioxidante apoplásticos.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de feijão-caupi, cultivar Pitiúba, foram desinfetadas pela imersão em solução 0,1 % de hipoclorito de sódio por 5 minutos, seguido de 3 lavagens consecutivas em H₂O deionizada. O semeio foi realizado em papel germinação (dimensões 28 x 38 cm) completamente umedecido com H₂O deionizada (2,5 mL g⁻¹ papel) de acordo com Vieira e Carvalho (1994). Os papéis foram enrolados e reunidos formando conjuntos de 4 rolos e envoltos com mais uma folha de papel de germinação embebida em água. Os sistemas foram cobertos por sacos plásticos e mantidos em câmara de crescimento a 27±2 °C, umidade relativa de 80±10 % e fotoperíodo de 12 horas com 240 μmol m⁻² s⁻¹ de radiação luminosa fotossinteticamente ativa.

5.2.2. Experimento I

Este experimento foi realizado para avaliar as flutuações de H₂O₂ em períodos de curta, média e longa duração e relacioná-las a possíveis danos causados por peroxidação de lipídeos em membranas celulares. Após o 4^o dia as plântulas foram separadas em dois lotes e tratadas com NaCl 0 e 100 mM sendo mantidas sob as mesmas condições iniciais de cultivo. As coletas de raízes foram realizadas em 3 séries temporais distintas: i. entre 0 e 180 minutos, a intervalos de 30 minutos; ii. entre 0 e 48 horas, a intervalos de 6 horas; e iii. entre 0 e 4 dias com intervalos de 1 dia (24 horas).

Amostras de tecido apical foram coletadas no 3^o dia (48 horas) para ensaios histoquímicos. Este tempo foi previamente apresentado como de maior percentual de danos de membranas (capítulo 4). O material de cada coleta foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C. Para a análise estatística utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 repetições e média de 2 experimentos. Os resultados foram

analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.3. Experimento II

A atividade metabólica da via apoplástica de produção e remoção de H_2O_2 foi avaliada neste experimento. Para tanto, no 4º dia após o semeio, as plântulas foram tratadas com 0 e 100 mM de NaCl, durante 24 e 48 horas. Uma parte do material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Outra parte foi utilizada imediatamente para extração de fluido apoplástico e membrana plasmática. Para a análise estatística, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial $2 \times 2 \times 1$ (doses de NaCl x tempos x cultivar), com 3 repetições e média de 2 experimentos. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.4. Experimento III

Este experimento teve como objetivo verificar a relação do metabolismo antioxidante apoplástico com o metabolismo antioxidativo do tecido como um todo. No 4º dia após o semeio, as plântulas foram tratadas com 0 e 100 mM de NaCl durante 24 e 48 horas. Uma parte das plântulas tratadas com 100 mM de NaCl por 24 horas, sofreram tratamento de recuperação pela transferência dessas plântulas para papéis umedecidos apenas com H_2O deionizada. A outra parte manteve-se sob tratamento salino. Ambos os tratamentos foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo iniciais.

Uma parte do material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenada em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A outra parte foi utilizada imediatamente para extração de fluido apoplástico. Para a análise estatística, foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial $3 \times 2 \times 1$ (tratamentos x tempos x cultivar), com 3 repetições e média de 2

experimentos. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.5. Histoquímica de danos de membranas e peroxidação de lipídeos

Raízes intactas de plântulas foram enxaguadas com 0,5 mM de CaCl_2 (pH 4,5), secas com papel de filtro e imediatamente imersas nos reagentes específicos. Para a detecção histoquímica da perda de integridade de membrana plasmática, foi utilizada metodologia adaptada de Yamamoto *et al.* (2001). As raízes foram incubadas em solução de azul de Evans (0,025 %, m/v) preparada em solução CaCl_2 100 μM (pH 5,6) por 24 horas a uma temperatura de 6 °C.

A detecção histoquímica de peroxidação de lipídios foi realizada com o uso do reagente de Shiff. Este reagente detecta aldeídos que são originados da peroxidação de lipídios (Pompella *et al.*, 1987). Para a reação, os ápices radiculares foram imersos no reagente por 60 minutos. Em seguida, as raízes coradas foram enxaguadas com $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0,5 % (preparado em HCl 0,05 M) até as raízes apresentarem coloração vermelho claro. Após as reações, todas as raízes foram lavadas 3 x com H_2O destilada abundante e foram observadas sobre uma lupa binocular acoplada a uma câmera digital.

5.2.6. Determinação do comprimento radicular e de lignina

O comprimento radicular foi mensurado de acordo com o item 2.2.3., página 67. A quantificação de lignina foi realizada com metodologia adaptada de Monties (1989). 0,25 g de tecidos frescos foram macerados com nitrogênio líquido. Aos macerados foi adicionado etanol (95 %, v/v) em excesso e, então, as suspensões foram aquecidas a 75 °C por 30 minutos. Alíquotas de 5 mg dos precipitados foram transferidas para tubos de plástico e misturados a uma solução composta de ácido tioglicólico 85 % e HCl 2 N, na proporção de 1:5 (v/v). As amostras foram incubadas a 95 °C, por 4 horas e agitadas ocasionalmente.

Após o tempo decorrido as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo e centrifugadas durante 10 minutos a $15.000 \times g$ e 25°C ("1"). O precipitado resultante foi recuperado e lavado 3 x com H_2O destilada. Em seguida os precipitados foram incubados com solução de NaOH 0,5 N por 18 horas a temperatura ambiente e agitação ocasional. As suspensões foram centrifugadas como em "1", os sobrenadantes foram reservados e os precipitados foram novamente ressuspendidos em NaOH 0,5 N, vigorosamente misturados e novamente centrifugados como em "1".

Os sobrenadantes resultantes foram combinados com os primeiros sobrenadantes alcalinos e misturados com HCl concentrado. As amostras foram incubadas por 4 horas a 4°C para precipitação dos derivados de lignotioglicolato. Em seguida foram novamente centrifugadas como em "1" e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados resultantes foram solubilizados em 2 mL de NaOH 0,5 N. As absorbâncias das soluções resultantes foram avaliadas a 280 nm. A curva de calibração foi obtida com o uso de lignina alcalina pura da Aldrich, realizando os mesmos procedimentos. A concentração de lignina nos tecidos foi expressa em $\text{mg g}^{-1}\text{MF}$.

5.2.7. Extratos brutos, extrato protéico de parede celular e extração de fluido apoplástico

A extração de H_2O_2 e produtos da peroxidação de lipídeos foi realizada com metodologias adaptadas de Heath e Packer (1968), Pedreira *et al.* (2004) e Zhou *et al.* (2006). As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e adicionadas a uma suspensão de TCA 1 % e carvão ativado 0,15 %. A mistura foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recuperado e utilizado imediatamente para a quantificação de H_2O_2 . Posteriormente o ensaio de peroxidação de lipídeos foi também realizado no mesmo extrato.

O extrato de proteínas solúveis totais foi obtido de acordo com Cavalcanti *et al.* (2004). As amostras foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 contendo ácido L-ascórbico 1 mM e ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM. Os macerados foram centrifugados a 13.000 x *g*, por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi considerado como fração de proteínas solúveis totais.

A extração de proteínas ligadas à parede celular foi realizada de acordo com Bacon *et al.* (1997). Inicialmente as amostras foram homogeneizadas em banho de gelo e tampão succinato de sódio 50 mM, pH 5,5 contendo CaCl₂ 10 mM e DTT 1 mM, na proporção de 1:5 (m/v). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2.000 x *g* por 5 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com o mesmo volume de tampão succinato de sódio 50 mM para remover a atividade de peroxidase citoplasmática. Após as lavagens o precipitado foi ressuscitado em tampão succinato de sódio acrescido de 1 M de NaCl para desassociar proteínas ligadas à parede celular.

A extração de fluido apoplástico foi adaptado de Sánchez *et al.* (1997) e Hernández *et al.* (2001). O fluido apoplástico, considerado fluido de lavagem intercelular, foi obtido a partir da infiltração do tecido com pressão leve e centrifugação com velocidade baixa. Para cada amostra, 4g de tecido fresco de raízes foram coletados, lavados rapidamente em solução de CaCl₂ 0,1 mM a 4 °C e então infiltrados por 5 minutos com a mesma solução a uma pressão de -2,0 kPa. Os tecidos foram secos levemente em papel atalhado e então transferidos para um tambor de seringa adaptado a um tubo de centrífuga.

As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 x *g* e 4 °C. A centrifugação causou o gotejamento do fluido apoplástico no fundo do tubo de centrífuga. Antes de cada centrifugação, para preservar um determinado conjunto de moléculas, adicionou-se ao fundo do tubo de centrífuga uma solução diferente: a) TCA 1 % + carvão ativado para H₂O₂; b) TCA 1 % para ascorbato; c) H₂O deionizada para fenóis; e d) tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 com EDTA ácido 0,1 mM para enzimas. O extrato de H₂O₂ foi novamente centrifugado a 10.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C para precipitação do carvão ativado e então foi imediatamente utilizado para o ensaio. Os demais extratos foram recuperados e armazenados em freezer -80 °C para posterior determinação. A quantificação do extrato protéico total,

de parede e do fluido apoplástico foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina para curva de calibração.

5.2.8. Isolamento de frações enriquecidas em membrana plasmática

O isolamento de frações de membrana plasmática foi realizado conforme Lehner e Borlak (2003). As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e em seguida adicionado extrator contendo tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 acrescido de manitol 250 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10 %, KCl 100 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM e fluoreto de fenilmetil sulfônico (PMSF) 1 mM, na proporção de 1:1 (massa de amostra/volume de extrator). A mistura foi centrifugada a 1.500 x *g* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrífuga e centrifugados a 100.000 x *g* por 1 hora a 4 °C.

O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,6 contendo glicerol 10 %, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM e DTT 5 mM (tampão de ressuspensão). Esta mistura foi aplicada em cima do gradiente descontínuo de sacarose composto de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, DTT 5 mM e sacarose 45 % (fase inferior) e 25 % (fase superior). O conjunto foi ultracentrifugado a 100.000 x *g* por 1 hora e 30 minutos a 4 °C. As frações enriquecidas com membrana plasmática foram coletadas entre a interface 25 e 45 % do gradiente e armazenadas em freezer -80 °C.

5.2.9. Determinação da concentração de ascorbato e fenóis

O ensaio de ascorbato total foi realizado de acordo com o método de Kampfenkel *et al.* (1995). Alíquotas de amostras foram inicialmente misturadas a 0,2 mL de DTT 10 mM dissolvido em tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,4. Na sequência foram adicionados 0,2 mL de solução de TCA 6 % e 0,4 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,4. As misturas foram incubadas por 15 minutos a 42 °C em banho-maria. Em seguida foram acrescentados 0,2 mL de solução N-etilmaleimida 0,5 % e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. Aos meios de

reação foram adicionados na sequência: 1 mL de TCA 10 %, 0,8 mL de H_3PO_4 42 % e 0,8 mL de 2,2'-bipiridil 4 % dissolvido em etanol 70 %. Ao final foram adicionados 0,4 mL de FeCl_3 3 % e imediatamente agitados vigorosamente. A solução foi incubada a 42 °C por 40 minutos e então procedida leitura a 525 nm. Os resultados foram expressos em $\text{nmol g}^{-1}\text{MF}$.

Para determinação dos teores de fenóis apoplásticos foi utilizado o método descrito por Ainsworth e Gillespie (2007). Para tanto, alíquotas de extratos foram acrescidos a 2 mL de H_2O deionizada e 0,4 mL de reagente Folin-Ciocalteu 1 N. A mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e então adicionado 0,4 mL de Na_2CO_3 35 %. A reação foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e, então, procedida leitura a 640 nm. A quantidade de fenóis no extrato foi obtida por comparação com curva de ácido pirogálico e expresso em $\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$.

5.2.10. Determinação de H_2O_2 e peroxidação de lipídeos

A concentração de H_2O_2 em raízes foi avaliada colorimetricamente pelo método de Cheeseman (2006). O ensaio foi realizado em tubos contendo os seguintes reagentes, na sequência: FeSO_4 (0,25 mM), H_2SO_4 (25 mM), alaranjado de xilenol (0,1 mM) e água para completar (0,9 mL). 0,1 mL de extrato foi adicionado e o volume final foi ajustado para 1 mL com água deionizada. Os brancos foram preparados substituindo a amostra por solução de TCA 1%. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e o complexo estável do alaranjado de xilenol com os íons férricos foi mensurado a 560 nm e expresso em $\text{nmol g}^{-1}\text{MF}$ para extrato total e $\text{pmol g}^{-1}\text{MF}$ para extrato apoplástico.

A peroxidação de lipídeos foi mensurada de acordo com o método descrito no item 2.2.4., página 67.

5.2.11. Ensaio enzimáticos

A atividade de piruvato quinase (PK) foi realizada de acordo com Kachmar e Boyer (1953). Alíquotas de 50 μL de extrato protéico foram adicionadas a 1 mL de

uma mistura contendo tampão Tris-HCl 50 μ M, pH 7,5, Tris-ADP 2,5 μ M, MgSO_4 8 μ M e KCl 50 μ M. A atividade foi iniciada com a adição de fosfoenolpiruvato dissódico (PEP) 1,5 μ M. A mistura foi incubada a 37 °C por 10 minutos e a reação foi parada pela adição de 2,4-dinitrophenyl hidrazina 0,0125 % em HCl 2 N. As concentrações de piruvato foram medidas pelo método colorimétrico da 2,4-dinitrophenyl hidrazina. Nos tubos do ensaio foram adicionados 2 mL de H_2O deionizada e 5 mL de NaOH 0,6 N. A reação foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram lidas a 510 nm e os resultados foram expressos em % de extravasamento em relação ao extrato bruto.

A atividade de NOX foi adaptada dos métodos de Xing *et al.* (1997), VanGestelen *et al.* (1997) e Barceló (1998). Para tanto, alíquotas da fração de membrana plasmática foram adicionadas a tampão MOPS-Tris 8,7 mM, pH 7,3 contendo MgCl_2 6,5 mM, KCl 87 mM, NaCl 2,6 mM, CaCl_2 1 mM, FAD 0,4 mM, GTP 1 mM, azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT) 4 mM e proteínas solúveis totais na proporção de 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A reação foi iniciada pela adição de NADPH 6,4 mM. O aumento na absorbância da mistura de reação, pela produção de formazana azul, foi avaliado a 530 nm contra um branco preparado na ausência da fração de membranas e os resultados foram expressos em $\text{pmol O}_2^{\bullet-} \text{mg}^{-1} \text{Proteínas min}^{-1}$. As reações inespecíficas foram obtidas realizando-se ensaios na presença de SOD (50 unidades mL^{-1}) e DPI 0,2 mM. Não houve reação na presença de SOD e o DPI inibiu a atividade em 20 % (dados não mostrados).

Para as atividades de SOD, CAT, APX e POX foram utilizadas as metodologias descritas no item 2.2.5., página 68.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Aspectos morfológicos de raízes e avaliação de séries temporais da concentração de H_2O_2 e peroxidação de lipídeos

Para descrever o metabolismo e a regulação do crescimento de raízes sob estresse salino, foram utilizadas plântulas de feijão-caupi com, no máximo, 8 dias de idade. O tratamento salino causou redução significativa no comprimento radicular, sem afetar o crescimento da parte aérea (Figura 1A e B). Adicionalmente, o tratamento causou enrijecimento e espessamento visível do tecido radicular. Os ápices radiculares apresentaram perda de integridade de membranas detectáveis pelo ensaio histoquímico (Figura 1C e D). Entretanto, não houve peroxidação de lipídios histoquimicamente detectada (Figura 1E e F).

As flutuações de H_2O_2 e peroxidação de lipídeos também foram avaliadas em 3 séries temporais distintas (Figura 2). As coletas realizadas de 0 a 180 minutos revelaram uma forte elevação da concentração de H_2O_2 em 120 minutos, seguida de um decréscimo até 180 minutos (Figura 2A). As coletas realizadas entre 0 e 48 horas apresentaram incremento na concentração de H_2O_2 (57,8 %), em 30 horas de tratamento, acompanhado de decréscimo gradual, até o tempo de 48 horas (Figura 2B). As coletas realizadas no período entre 0 e 4 dias apresentaram tendência de decréscimo da concentração de H_2O_2 a partir do 3º dia, chegando ao mínimo (64,3 % menos) em 4 dias de tratamento (Figura 2C). Não houve alterações significativas na peroxidação de lipídeos em todas as séries temporais observadas (Figura 2D, E e F).



Figura 1 – Aspectos gerais de plântulas de feijão-caupi cv. Pitiúba no 6º dia após o semeio e 48 horas de tratamento com 100 mM de NaCl. Morfologia das plântulas de feijão-caupi (A – controle, B – tratadas com 100 mM de NaCl). Integridade de membranas *in vivo* em segmentos apicais de raízes de feijão-caupi (C – controle e D – tratadas com 100 mM de NaCl). Peroxidação de lipídeos *in vivo* em segmentos apicais de raízes de feijão-caupi (E – controle e F – tratadas com 100 mM de NaCl).

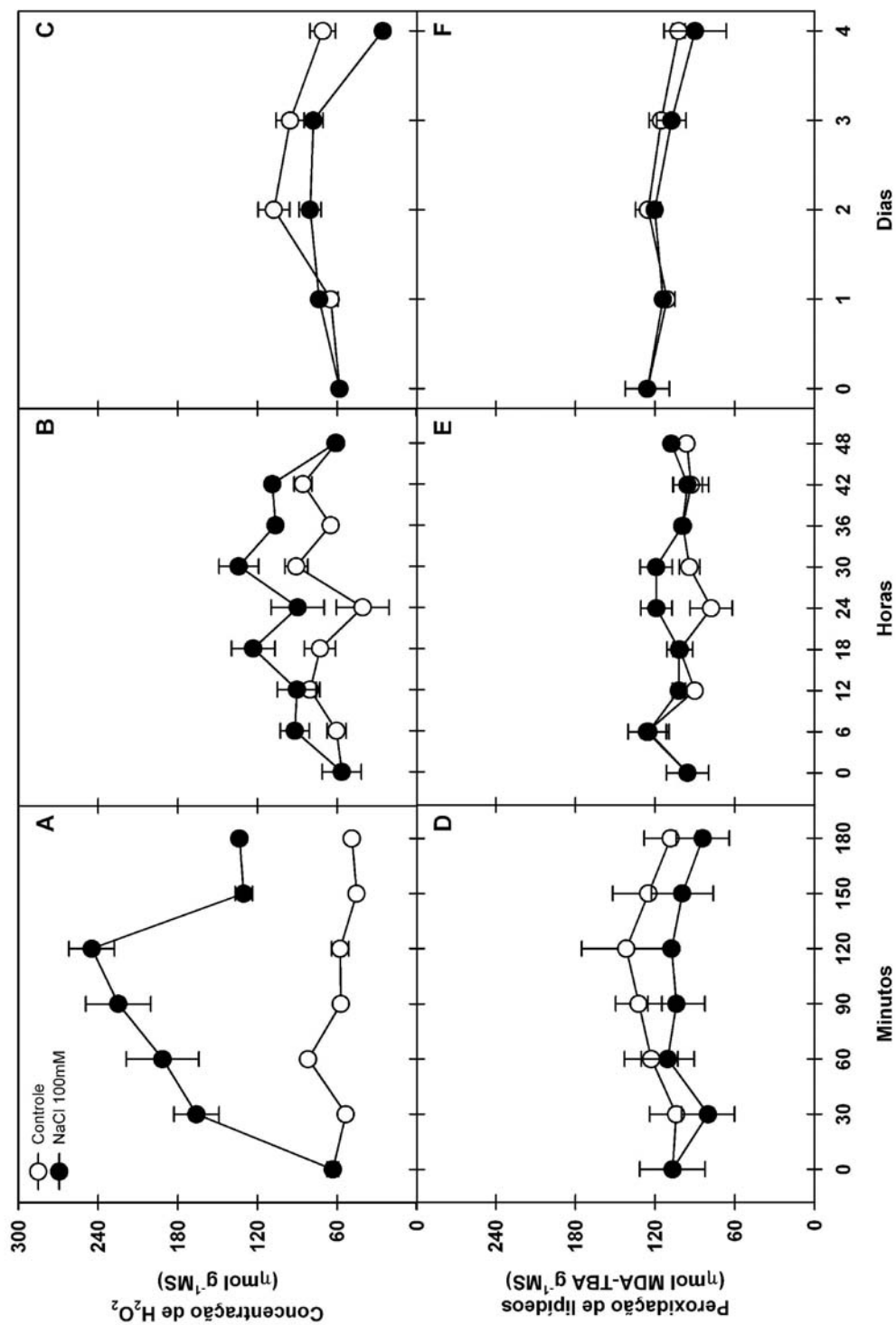


Figura 2 – Concentração de H_2O_2 (A, B e C) e peroxidação de lipídeos (D, E e F) em raízes de plântulas de feijão-caupi submetidas 0 – controle e 100 mM de NaCl durante 180 minutos (A e D), 48 horas (B e E) e 4 dias (C e F). Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.3.2. Atividade da via de produção/remoção de H_2O_2 apoplástica de raízes

A atividade de produção e remoção de H_2O_2 apoplástico foi verificado pelo estudo de enzimas que contribuem com a produção de lignina (NOX, SOD, POX). A atividade de produção de $O_2^{\bullet-}$ em raízes foi determinada pelo ensaio de NOX em membrana plasmática. A atividade desta enzima manteve tendência de aumento entre os períodos de 24 e 48 horas. No tempo de 24 horas, houve aumento de 42 %, enquanto em 48 horas o aumento foi de 22,5 %. A atividade de NOX também aumentou significativamente nos controles, entre o período de 24 e 48 horas de tratamento (38 %) (Figura 3A).

A atividade de SOD apresentou tendência significativa de aumento entre 24 e 48 horas. Enquanto que no período de 24 horas houve aumento de 10,6 %, a atividade desta enzima aumentou em 37 % após 48 horas de tratamento (Figura 3B). A POX apresentou incremento significativo entre os períodos de 24 e 48 horas quando as raízes foram tratadas com NaCl (Figura 3C). No tempo de 24 horas houve um aumento de 23 % e em 48 horas um aumento de 31,3 % na atividade desta enzima. Não houve diferenças significativas entre os controles.

A concentração de H_2O_2 apoplástica, em raízes tratadas com sal, diminuiu significativamente em relação ao controle nos dois intervalos de tempo (Figura 4A). Em 24 horas, a concentração de H_2O_2 reduziu 42 %, enquanto que, em 48 horas, houve redução de 50 %. A concentração nos dois intervalos de tempo para cada controle foi diferente e maior nas 48 horas. O conteúdo de lignina aumentou em raízes tratadas com NaCl (Figura 4B). Em 24 horas houve acréscimo de 27,7 %, e em 48 horas este acréscimo foi apenas de 13,5 % em relação aos respectivos controles. Raízes do tratamento controle apresentaram tendência de aumento (18,6 %) entre 24 e 48 horas de exposição ao sal.

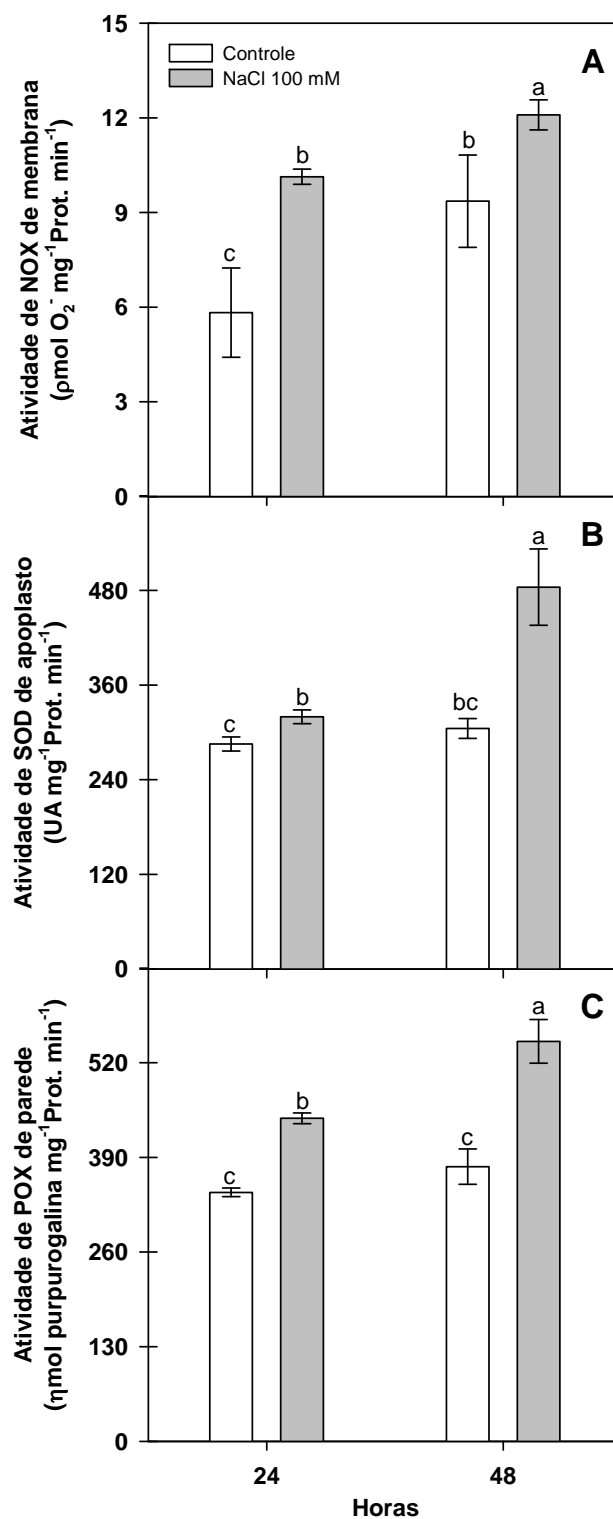


Figura 3 – Atividade de oxidase de NADPH (NOX) de membrana plasmática (A), dismutase de superóxido (SOD) apoplástica (B) e peroxidase de fenóis (POX) de parede celular (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 24 e 48 horas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

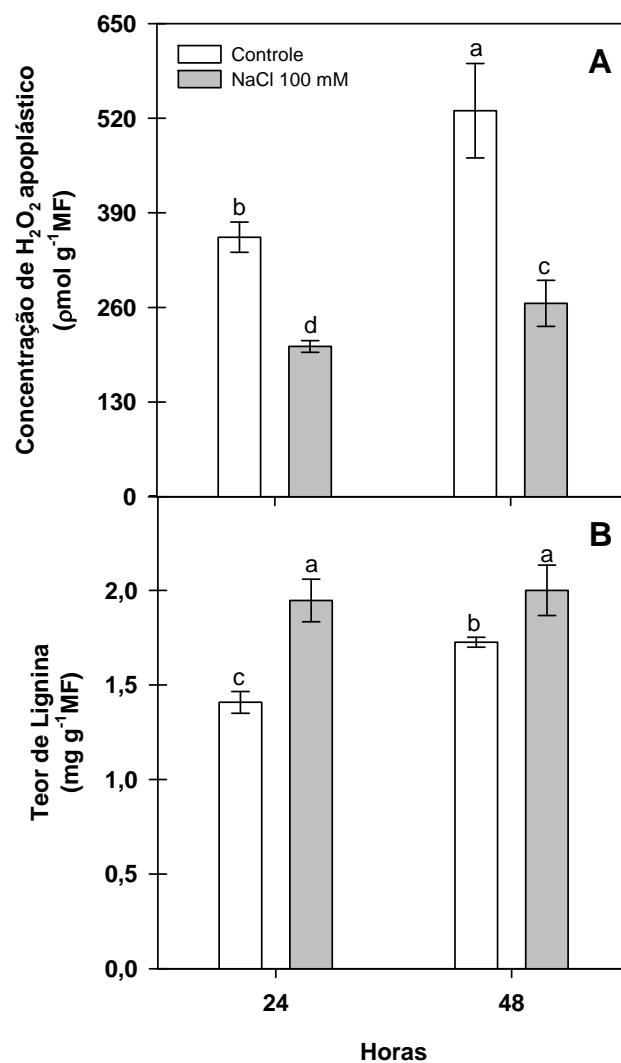


Figura 4 – Concentração de H_2O_2 apoplástico (A) e teor de lignina (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condição controle e tratadas com 100 mM de NaCl por 24 e 48 horas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

5.3.3. Relação apoplasto x extrato total: regulação metabólica das vias de produção/remoção de H₂O₂

A relação apoplasto x extrato total em raízes foi avaliada em experimentos com plântulas não tratadas (controle) e tratadas com NaCl durante 24 e 48 horas (C-24, S-24, C-48 e S-48) e plântulas tratadas por 24 horas e recuperadas por mais 24 horas (Rec). O grau de pureza dos extratos apoplásticos e de parede celular foi obtido pela determinação da atividade de piruvato quinase (PK) (Tabela 1). O percentual de atividade desta enzima nas frações determina quanto de citosol pode ter contaminado as frações isoladas. Em média, houve 5 % de contaminação de citosol na fração apoplástica e 10 % na fração de proteínas de parede. Os extratos foram mais contaminados nas frações dos tratamentos S-48 e Rec.

Tabela 1 – Percentual de atividade de piruvato quinase (PK) em fração apoplástica e de parede celular

Tratamentos	% Extravasamento*	
	Extrato de apoplasto	Extrato de parede celular
C-24	3,90±0,28	8,20±0,60
S-24	3,80±0,57	7,98±1,19
C-48	4,96±1,72	10,42±3,62
S-48	6,52±1,57	13,70±3,29
Rec	6,70±0,37	14,06±0,79

*Dados relacionados aos valores de extrato total.

Para avaliar os efeitos causados pelo tratamento salino no crescimento realizou-se a análise do comprimento radicular (Figura 5A). A exposição ao sal causou redução média de 16,5 % no comprimento radicular em ambos os tempos. A re-hidratação dos tecidos por 24 horas induziu recuperação no comprimento radicular de plântulas estressadas (Figura 5A – Rec). A atividade de POX total e apoplástica apresentaram tendência de aumento entre os períodos de 24 e 48 horas (Figuras 5B e C).

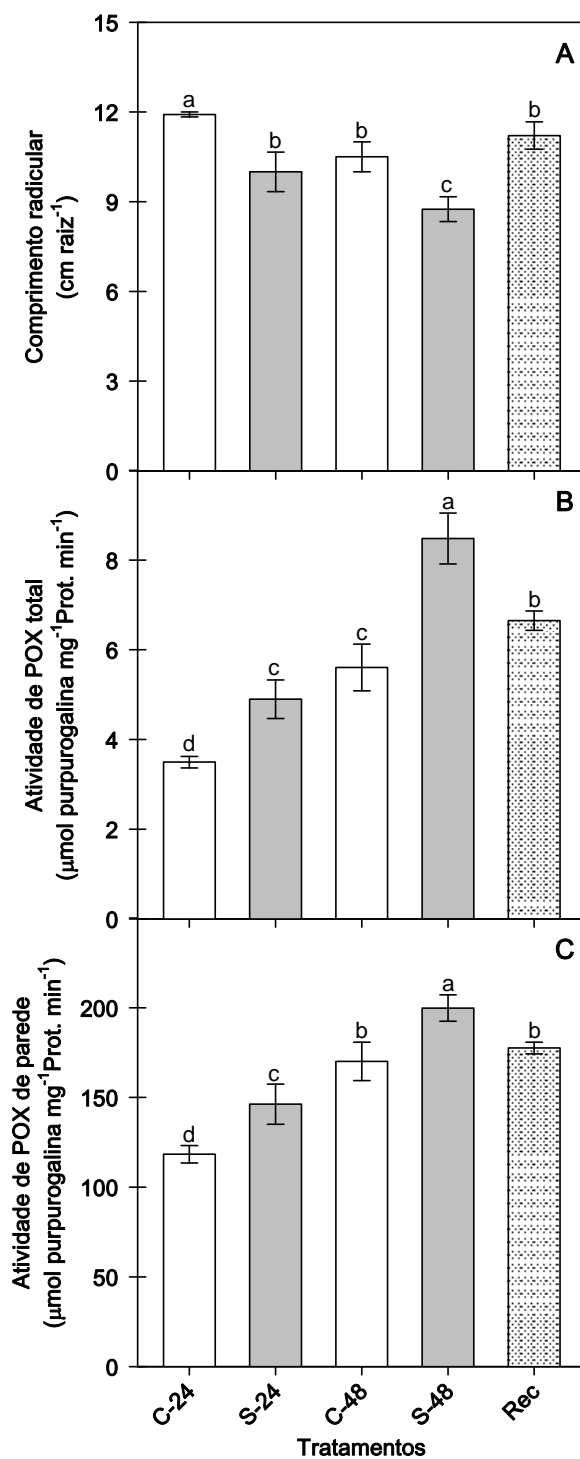


Figura 5 – Comprimento radicular (A), atividade de peroxidase de fenóis (POX) total (B) e atividade de peroxidase de fenóis (POX) apoplástica (C) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condições controle (0 mM de NaCl) e tratadas com 100 mM de NaCl durante 24 e 48 horas. Tratamentos: controle-24 horas (C-24); 100 mM de NaCl-24 horas (S-24); controle-48 horas (C-48); 100 mM de NaCl-48 horas (S-48); 100 mM de NaCl-24 horas → H₂O-24 horas (Rec). As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

O tratamento salino durante 24 horas causou um aumento médio de 23,8 % na atividade de POX, enquanto que o tratamento salino durante 48 horas causou um aumento de 34,1 % na atividade desta enzima, nos dois extratos. O tratamento Rec induziu decréscimo na atividade de POX tanto no apoplasto como no extrato total, quando comparado as raízes tratadas com sal nos dois intervalos de tempo.

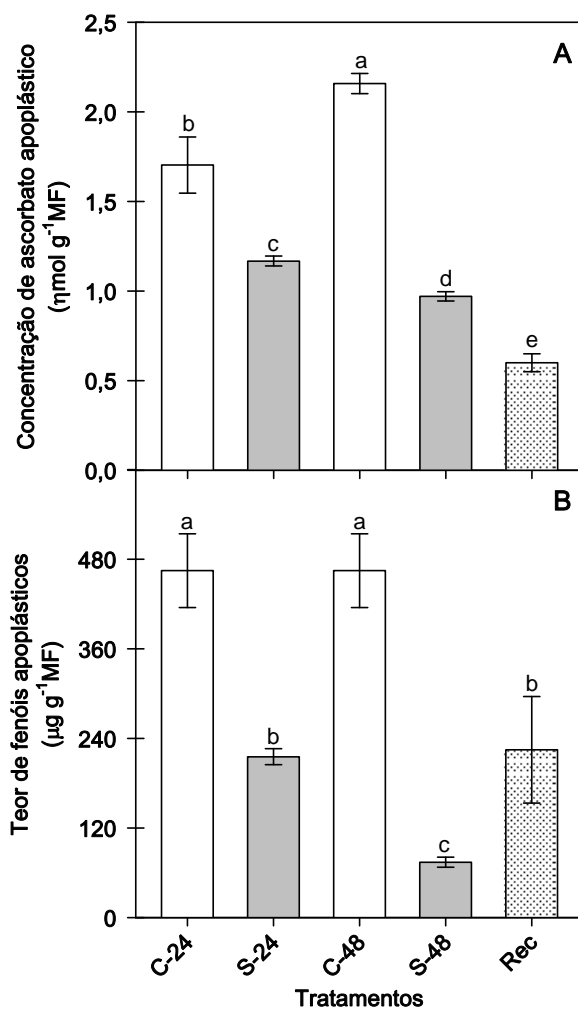


Figura 6 – Concentração de ascorbato apoplástico (A) e teor de fenóis apoplásticos (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condições controle (0 mM de NaCl) e tratadas com 100 mM de NaCl durante 24 e 48 horas. Tratamentos: controle-24 horas (C-24); 100 mM de NaCl-24 horas (S-24); controle-48 horas (C-48); 100 mM de NaCl-48 horas (S-48); 100 mM de NaCl-24 horas → H₂O-24 horas (Rec). As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

O tratamento salino causou redução de 31,4% na concentração de ascorbato apoplástico em 24 horas de tratamento, enquanto que esse decréscimo foi de 54,9 % em 48 horas de tratamento (Figura 6A). Na recuperação, foi observado diminuição no teor de ascorbato ainda mais significativa (72 % em relação ao tratamento C-48). O tratamento salino, independente do tempo de exposição, reduziu o teor de fenóis do apoplasto. Entretanto, esta redução (91,5 %) foi mais pronunciada após 48 horas de tratamento (Figura 6B). Contudo, o tratamento de recuperação causou aumento no conteúdo destas moléculas na fração apoplástica, alcançando o nível do tratamento C-24.

A atividade de SOD no extrato total e apoplástico, bem como o conteúdo de H_2O_2 nessas frações foram analisadas para a compreensão das interações entre os “*pools*” de H_2O_2 apoplástico e total. A atividade de SOD total não variou significativamente em presença do sal nos dois tempos de exposição (Figura 7A). Contudo, a atividade desta enzima no extrato apoplástico aumentou significativamente em 48 horas de tratamento com NaCl (37 %) (Figura 7B). Não foi observada recuperação na atividade desta enzima, após um período de 24 horas na ausência de sal. O conteúdo de H_2O_2 foi modificado em ambos os extratos (Figura 7C e D). O tratamento salino, por 48 horas, aumentou o conteúdo de H_2O_2 total (Figura 7C). Não houve recuperação no conteúdo de H_2O_2 em relação ao tratamento C-24. O conteúdo de H_2O_2 no apoplasto sofreu mais alterações do que no extrato total (Figura 7D). Em 24 horas de tratamento, a concentração de H_2O_2 reduziu 42 % em relação ao C-24. Em 48 horas, a concentração dessa molécula foi reduzida em 50 % quando comparado ao C-48. O tratamento Rec induziu uma forte queda na concentração de H_2O_2 (84,3 % em relação ao C-48).

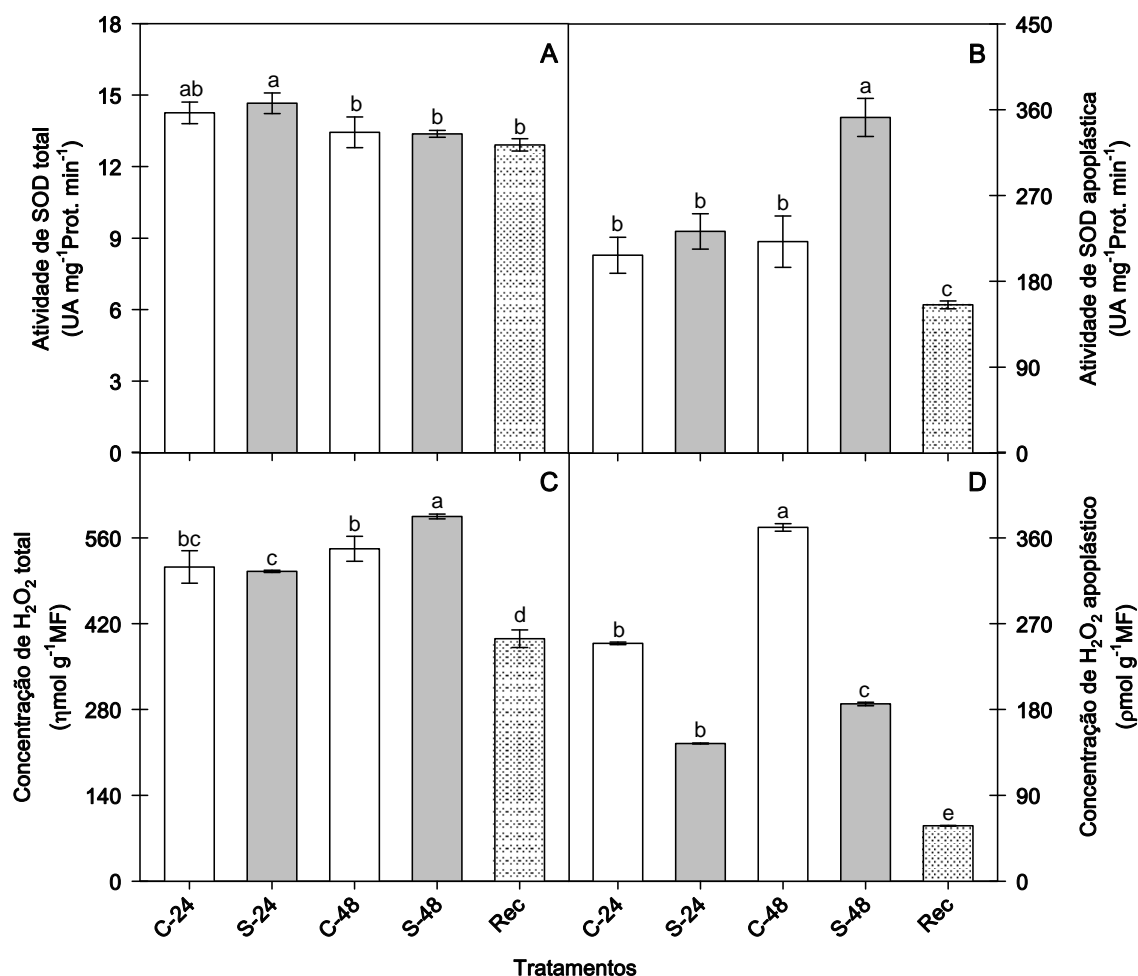


Figura 7 – Atividade de dismutase de superóxido (SOD) total (A), atividade de dismutase de superóxido (SOD) apoplástica (B), concentração de H₂O₂ total (C) e concentração de H₂O₂ apoplástico (D) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condições controle (0 mM de NaCl) e tratadas com 100 mM de NaCl durante 24 e 48 horas. Tratamentos: controle-24 horas (C-24); 100 mM de NaCl-24 horas (S-24); controle-48 horas (C-48); 100 mM de NaCl-48 horas (S-48); 100 mM de NaCl-24 horas → H₂O-24 horas (Rec). As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

Para avaliar a interação do tratamento salino com a resposta antioxidante intracelular, foram avaliadas as atividades de APX e CAT totais (Figura 8). A atividade de APX apresentou redução média de 42,5 % nos tratamentos S-24 e S-48 em relação aos seus respectivos controles. O tratamento Rec causou aumento na atividade desta enzima, alcançando os mesmos patamares do tratamento C-24. A

atividade de CAT não apresentou mudanças significativas em raízes tratadas por 24 horas com NaCl. Entretanto, o tratamento salino durante 48 horas causou redução drástica de 68 % na atividade desta enzima. A recuperação provocou aumento na atividade de CAT, embora ainda 33,5 % inferior ao tratamento C-48.

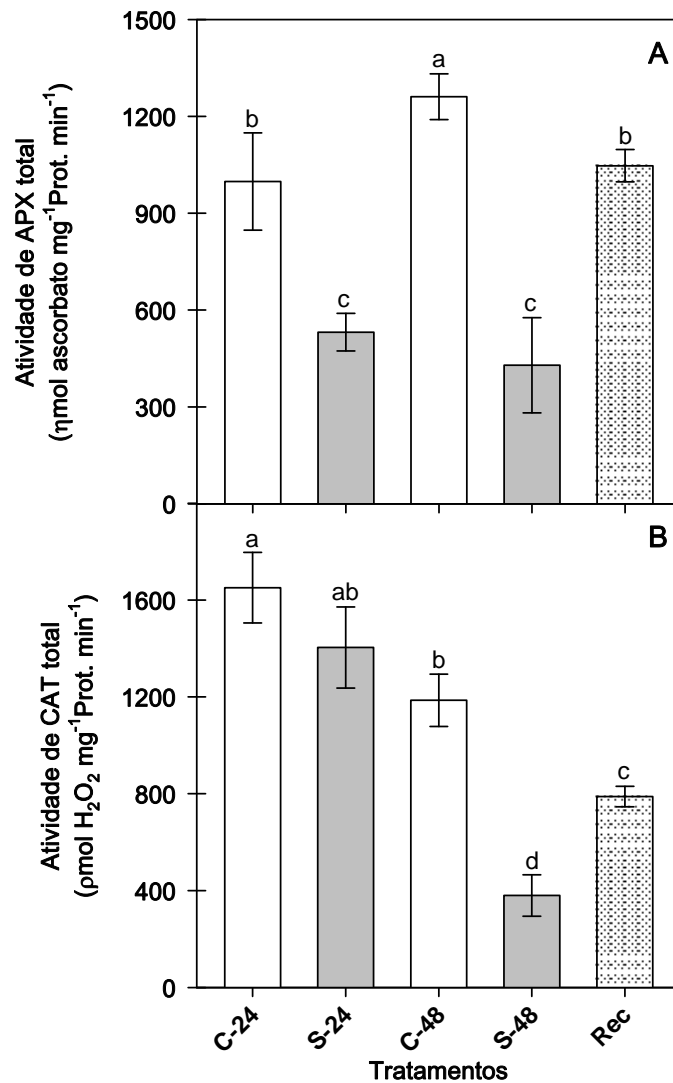


Figura 8 – Atividade de peroxidase de ascorbato (APX) total (A) e catalase (CAT) total (B) em raízes de plântulas de feijão-caupi, cultivadas sob condições controle (0 mM de NaCl) e tratadas com 100 mM de NaCl durante 24 e 48 horas. Tratamentos: controle-24 horas (C-24); 100 mM de NaCl-24 horas (S-24); controle-48 horas (C-48); 100 mM de NaCl-48 horas (S-48); 100 mM de NaCl-24 horas → H₂O-24 horas (Rec). As letras sobre as barras indicam diferenças significativas testada por Tukey ($p \leq 0,05$).

5.4. DISCUSSÃO

Plântulas de feijão-caupi cv. Pitiúba foram tratadas com 100 mM de NaCl em três experimentos independentes, no intuito de testar a hipótese de que o tratamento salino causa diminuição no comprimento radicular, através da indução de mecanismos metabólicos antioxidantes apoplásticos. As raízes apresentaram redução notória no comprimento radicular, sem estar associado a danos de membranas causados por peroxidação de lipídeos. Essas evidências reforçam os resultados dos capítulos anteriores onde (ao contrário dos danos de membranas) a peroxidação de lipídeos não foi detectada por ensaios *in vitro*. Assim, nossos resultados são evidências de que o estresse iônico, causado pelo tratamento salino não induziu danos oxidativos nos lipídeos de membranas de raízes.

Cavalcanti *et al.* (2004) identificou que o aumento do índice de peroxidação de lipídeos em folhas de feijão-caupi, tratadas com NaCl, pode estar relacionado ao efeito osmótico da salinidade. Outros trabalhos em nosso grupo de pesquisa mostraram que tratamento por seca moderada em feijão-caupi pode induzir aumento do índice de peroxidação de lipídeos em raízes de plântulas (Maia, 2004). Esses resultados se contrapõem aos deste trabalho, que em nenhum dos experimentos foi detectado peroxidação de lipídeos. Tais diferenças, possivelmente possam indicar que o aumento da peroxidação de lipídeos, nesta espécie, está diretamente relacionado ao estresse osmótico.

Na tentativa de relacionar o estresse oxidativo ao estresse iônico, raízes foram tratadas com 100 mM de NaCl e coletadas em 3 séries temporais distintas: 0 a 180 minutos, 0 a 48 horas e 0 a 4 dias. Somente as coletas realizadas entre 0 e 180 minutos detectaram aumento significativo da concentração de H_2O_2 . Nenhuma das séries temporais apresentou mudanças no índice de peroxidação de lipídeos que justificasse danos oxidativos. Esses resultados sugerem que as raízes não apresentaram danos causados por oxidação nos lipídeos das membranas. Contrariamente, o aumento drástico na concentração de H_2O_2 em 120 minutos de tratamento indica ocorrência do fenômeno denominado de explosão oxidativa (Minibaeva e Gordon, 2003; Foyer e Noctor, 2005). De acordo com Bolwell *et al.*

(1998) e Mahalingam e Fedorof (2003) este processo é transiente e ocorre muito rapidamente, dentro de segundos, em sistemas como culturas de células de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*). Após a detecção do estresse, é desencadeada uma resposta hipersensitiva, responsável pelo amadurecimento precoce dos tecidos o que é causada pela ativação do metabolismo antioxidativo apoplástico (Passardi *et al.*, 2004; Foyer e Noctor, 2005).

Para corroborar a hipótese de que o tratamento salino causou a ativação do metabolismo oxidativo apoplástico, as atividades de NOX de membrana, SOD de apoplasto e POX de parede celular foram avaliadas. As atividades dessas 3 enzimas aumentaram a partir de 24 horas de tratamento. Segundo Foyer e Noctor (2005), a NOX participa ativamente da resposta hipersensitiva através da produção de radicais $O_2^{\cdot-}$. Os EROs produzidos pela NOX são espontaneamente convertidos a H_2O_2 em uma reação que pode ser catalisada por uma Cu/Zn-SOD detectada em apoplasto (Ogawa *et al.*, 1996; Sgherri *et al.*, 2007). Por sua vez, uma POX ligada ionicamente à parede celular pode utilizar esses EROs como oxidantes para a formação de monômeros de lignina (Passardi *et al.*, 2004).

Juntamente com o aumento na atividade de NOX, SOD e POX, ocorreu redução no conteúdo de H_2O_2 apoplástico e aumento significativo no teor de lignina dos tecidos. A redução no conteúdo de H_2O_2 desse compartimento pode ser confirmada pelo decréscimo no conteúdo de fenóis livres em apoplasto. O consumo dessas duas moléculas possivelmente se deve à atividade de POX direcionada para a deposição de lignina na parede celular. Pode-se inferir, portanto, que o decréscimo no comprimento da raiz deve-se à intensa atividade de produção de lignina por uma isoforma de POX associada à parede celular. Este processo interfere, principalmente, na taxa de alongamento das células (Passardi *et al.*, 2004). Mecanismos que interferem na divisão de células não foram abordados neste trabalho. Descrições de redução da taxa de crescimento, relacionadas a um aumento da atividade de POX, são relativamente comuns na literatura (Horemans *et al.*, 2000; Lin e Kao, 2002; Cavalcanti *et al.*, 2004; Passardi *et al.*, 2004; Foyer e Noctor, 2005).

Da perspectiva do alongamento celular, o crescimento da raiz é um processo finamente regulado pelos níveis de ascorbato e pela relação entre a taxa de

“afrouxamento” e endurecimento da parede. Devido à ausência de NAD(P)H e de glutathione no apoplasto, o ascorbato possui o papel de regular a homeostase redox desse compartimento (Foyer e Noctor, 2005). Contudo, a via de degradação do ascorbato é iniciada no apoplasto o que torna a regulação da homeostase redox muito sensível a perturbações como uma explosão oxidativa (Horemans *et al.*, 2000; Foyer e Noctor, 2005). Essas perturbações na homeostase redox influenciam fortemente no funcionamento de isoformas de POX presentes neste compartimento. Já as taxas de afrouxamento e endurecimento, além de serem controladas pelos níveis de ascorbato, também sofrem influências do comportamento de isoformas de POX (Minibaeva e Gordon, 2003; Passardi *et al.*, 2004).

De acordo com Passardi *et al.* (2004) as POX podem regular o crescimento por dois ciclos metabólicos distintos. Elas podem favorecer a alongação pela geração de radicais de oxigênio ou inibir o crescimento controlando a concentração local de H_2O_2 . Em nossos resultados, a concentração de ascorbato decresce vertiginosamente, inclusive quando as raízes são submetidas a tratamento de recuperação. Adicionalmente, a concentração de fenóis apoplásticos apresenta tendência de aumento, quando as raízes sofrem tratamento de recuperação. Esses indícios sugerem fortemente que a via de produção de lignina em raízes de feijão-caupi é regulada pelo “pool” de ascorbato presente neste compartimento. Entretanto, a retomada do alongamento celular não é provocada pela formação de EROs originados de ascorbato, indicando que outras isoformas de POX podem estar relacionadas ao mecanismo de retomada de crescimento. De fato, para que o ascorbato possa gerar HO^\bullet outras EROs, como o H_2O_2 , devem estar presentes no compartimento (Passardi *et al.*, 2004), fato não observado na série temporal de 0 a 48 horas.

A regulação no crescimento celular também é auxiliada por mecanismos intracelulares. Foyer e Noctor (2005) explicam que sob ataque de patógenos, receptores específicos de membrana plasmática se oxidam com a explosão oxidativa e ativam uma cascata específica de MAP quinases. Isto culmina na inativação e na diminuição da expressão de enzimas antioxidantes intracelulares para manutenção do “pool” de H_2O_2 em níveis ideais para a sinalização da morte celular programada.

Em nossos estudos, contrariamente à atividade de SOD apoplástica, a atividade de SOD total não apresentou modificações significativas em sua atividade. Adicionalmente, o “pool” de H_2O_2 total apresentou tendência discreta de aumento em 48 horas de tratamento. Esse comportamento foi associado a decréscimos nas atividades de APX e CAT, indicando que estas enzimas (observada também nos capítulos 2, 3 e 4) podem ser importantes para a regulação do crescimento e raízes.

5.5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados são indicativos de que o tratamento salino pode ter simulado (parcialmente) uma resposta utilizada em ataque de patógeno avirulento. No contexto da resposta, o H_2O_2 participa ativamente como sinalizador e coadjuvante na lignificação da parede. A atividade de POX é efetivamente participante da regulação do crescimento celular. Estes mecanismos são finamente regulados pelos níveis de ascorbato e pelo “pool” de H_2O_2 apoplástico. Adicionalmente, a manutenção da concentração de H_2O_2 no tecido pode ser um reflexo da diminuição da atividade de enzimas como peroxidase de ascorbato e catalase no extrato total.

5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v.2, p.875-877, 2007.

BACON, M. A.; THOMPSON, D. S.; DAVIES, W. J. Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium temulentum* L. during drought? **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.2075-2085, 1997.

BARCELO, A. R. The generation of H_2O_2 in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. **Planta**, v.207, p.207-216, 1998.

BEAUCHAM, C.; FRIDOVIC, I. Superoxide Dismutase - Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-8, 1971.

BOLWELL, G. P.; DAVIES, D. R.; GERRISH, C.; AUH, C. K.; MURPHY, T. M. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. **Plant Physiology**, v.116, p.1379-1385, 1998.

BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CAROL, R. J.; DOLAN, L. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1829-1834, 2006.

CAVALCANTI, F. R.; LIMA, J. P. M. S.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.591-600, 2007.

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v.163, p.563-571, 2004.

CHEESEMAN, J. M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.2435-2444, 2006.

DE CNODDER, T.; VISSENBERG, K.; VAN DER STRAETEN, D.; VERBELEN, J. P. Regulation of cell length in the *Arabidopsis thaliana* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: a matter of apoplastic reactions. **New Phytologist**, v.168, p.541-550, 2005.

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H. F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M. A.; LINSTAD, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J. D. G.; DAVIES, J. M.; DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v.422, p.442-446, 2003.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v.17, p.1866-1875, 2005.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts .2. Role of Electron Transfer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.850-8, 1968.

HERNANDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMENEZ, A.; BARCELO, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ 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.

HOREMANS, N.; FOYER, C. H.; ASARD, H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. **Trends in Plant Science**, v.5, p.263-267, 2000.

KACHMAR, J. F.; BOYER, P. D. Kinetic Analysis of Enzyme Reactions .2. The Potassium Activation and Calcium Inhibition of Pyruvic Phosphoferase. **Journal of Biological Chemistry**, v.200, p.669-682, 1953.

KAMPFENKEL, K.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Extraction and Determination of Ascorbate and Dehydroascorbate from Plant-Tissue. **Analytical Biochemistry**, v.225, p.165-167, 1995.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.

LEHNER, I.; BORLAK, J. An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. **Electrophoresis**, v. 24, p.1795-1808, 2003.

LIN, C. C.; KAO, C. H. Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.37, p.177-183, 2002.

MAHALINGAM, R.; FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.56-68, 2003.

MINIBAEVA, F. V.; GORDON, L. K. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.50, p.411-416, 2003.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

MONTIES, B. Lignins, In: DEY, P. M.; Harborne, J. B. (eds.) *Methods in Plant Biochemistry*, New York: Academic Press, p.113-157, 1989.

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.

NETO, A. D. D.; PRISCO, J. T.; ENEAS, J.; DE ABREU, C. E. B.; GOMES, 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.

OGAWA, K.; KANEMATSU, S.; ASADA, K. Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. **Plant and Cell Physiology**, v.37, p.790-799, 1996.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v.9, p.534-540, 2004.

PEDREIRA, J.; SANZ, N.; PENA, M. J.; SANCHEZ, M.; QUEIJEIRO, E.; REVILLA, G.; ZARRA, I. Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pine hypocotyls. **Plant and Cell Physiology**, v.45, p.530-534, 2004.

POMPELLA, A.; MAELLARO, E.; CASINI, A. F.; FERRALI, M.; CICCOLI, L.; COMPORTI, M. Measurement of Lipid-Peroxidation In vivo - a Comparison of Different Procedures. **Lipids**, v.22, p.206-211, 1987.

QIN, W. M.; LAN, W. Z.; YANG, X. Involvement of NADPH oxidase in hydrogen peroxide accumulation by *Aspergillus niger* elicitor-induced *Taxus chinensis* cell cultures. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.355-361, 2004.

SANCHEZ, M.; REVILLA, G.; ZARRA, I. Changes in Peroxidase-Activity Associated with Cell-Walls during Pine Hypocotyl Growth. **Annals of Botany**, v.75, p.415-419, 1995.

SCHWEIKERT, C.; LISZKAY, A.; SCHOPFER, P. Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. **Phytochemistry**, v.53, p.565-570, 2000.

SGHERRI, C.; QUARTACCI, M. F.; NAVARI-IZZO, F. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1152-1160, 2007.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v.161, p.613-619, 2001.

VANGESTELLEN, P.; ASARD, H.; CAUBERGS, R. J. Solubilization and separation of a plant plasma membrane NADPH-O-2(-) synthase from other NAD(P)H oxidoreductases. **Plant Physiology**, v.115, p.543-550, 1997.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

XING, T.; HIGGINS, V. J.; BLUMWALD, E. Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. **Plant Cell**, v.9, p.249-259, 1997.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, v.125, p.199-208, 2001.

ZHOU, B. Y.; WANG, J. H.; GUO, Z. F.; TAN, H. Q.; ZHU, X. C. A simple colorimetric method for determination of hydrogen peroxide in plant tissues. **Plant Growth Regulation**, v.49, p.113-118, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo tratou de avaliar o comportamento fisiológico e o metabolismo antioxidante de raízes de feijão-caupi sob estresse salino. Uma comparação prévia foi realizada entre duas cultivares (Pérola e Pitiúba) consideradas contrastantes quanto à sensibilidade ao estresse salino. Isto possibilitou concluir que raízes de plântulas de feijão-caupi não são afetadas por estresse oxidativo causado pela salinidade. Possivelmente, diferentes cultivares podem apresentar diferenças mínimas quanto a resposta antioxidante enzimática.

Determinou-se também que um tratamento com 100 mM de NaCl causa danos de membranas severos, enquanto um tratamento com 50 mM de NaCl causa somente danos moderados em raízes. A severidade do estresse depende, portanto, do tempo de exposição ao tratamento e à concentração de NaCl utilizada. Contudo, um tratamento com dose moderada (50 mM) não é suficiente para causar mudanças significativas no padrão de enzimas antioxidantes de raízes de feijão-caupi. Em todos os experimentos não foi detectado danos oxidativos relacionados à peroxidação de lipídeos. Este fato possivelmente é um indicativo de que o efeito iônico do estresse salino, de fato, não causa danos oxidativos aparentes nos lipídeos de membranas de feijão-caupi.

Para tentar explicar a relação existente entre o metabolismo oxidativo e o estresse salino realizou-se diversas determinações com o objetivo de descrever o metabolismo antioxidante de raízes. Uma explicação plausível é que a resposta antioxidante pode simular parcialmente uma resposta hipersensitiva. A comprovação deste fato está nas determinações de oxidase de NADPH de membrana, dismutase de superóxido de apoplasto e peroxidase de fenóis de parede, além das atividades enzimáticas totais. Essas enzimas apresentaram aumento de atividade precedido de uma explosão oxidativa. Verificou-se também um suposto envolvimento do H_2O_2 como sinalizador celular de estresse e coadjuvante na lignificação da parede. A atividade de peroxidase de parede celular também foi descrita como efetivamente participante da regulação do crescimento celular.

Por fim, obtiveram-se fortes indícios de que os mecanismos de regulação do crescimento durante estresse salino podem ser regulados pelo “pool” de H_2O_2 apoplástico e, possivelmente, pelo ascorbato do meio. Adicionalmente, a manutenção da concentração de H_2O_2 no tecido pode ser um reflexo da diminuição da atividade de enzimas antioxidantes intracelulares. Essa análise está resumida na Figura 1.

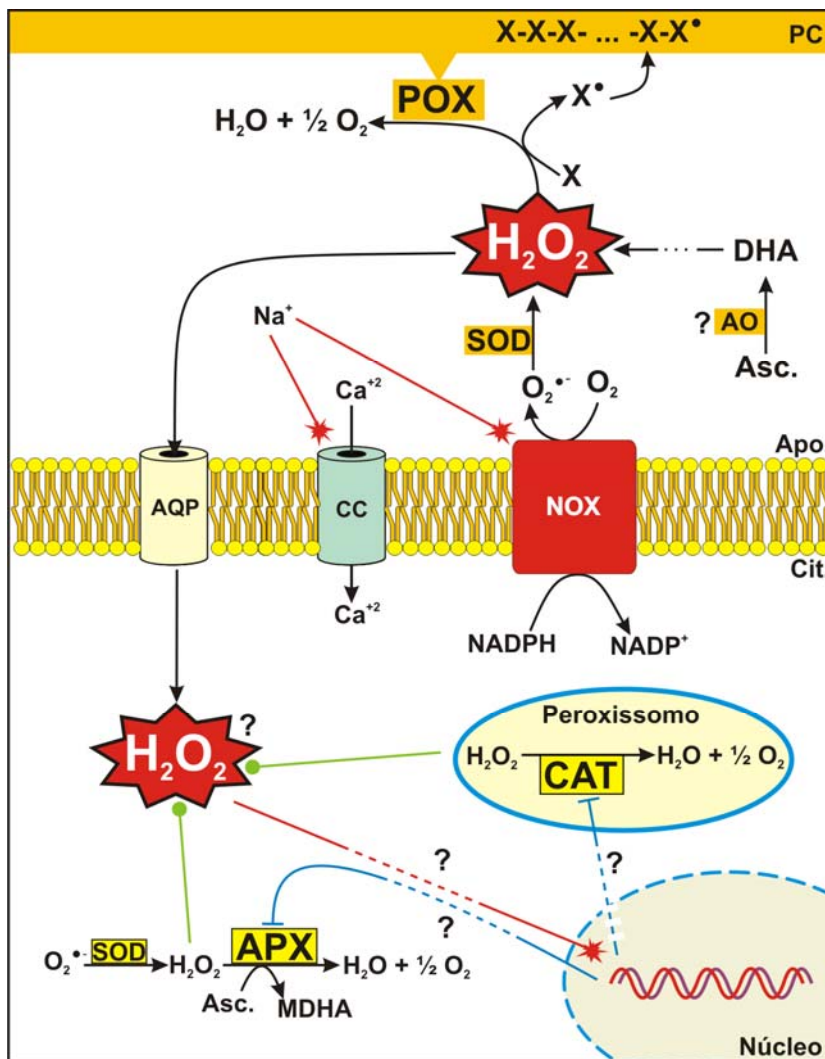
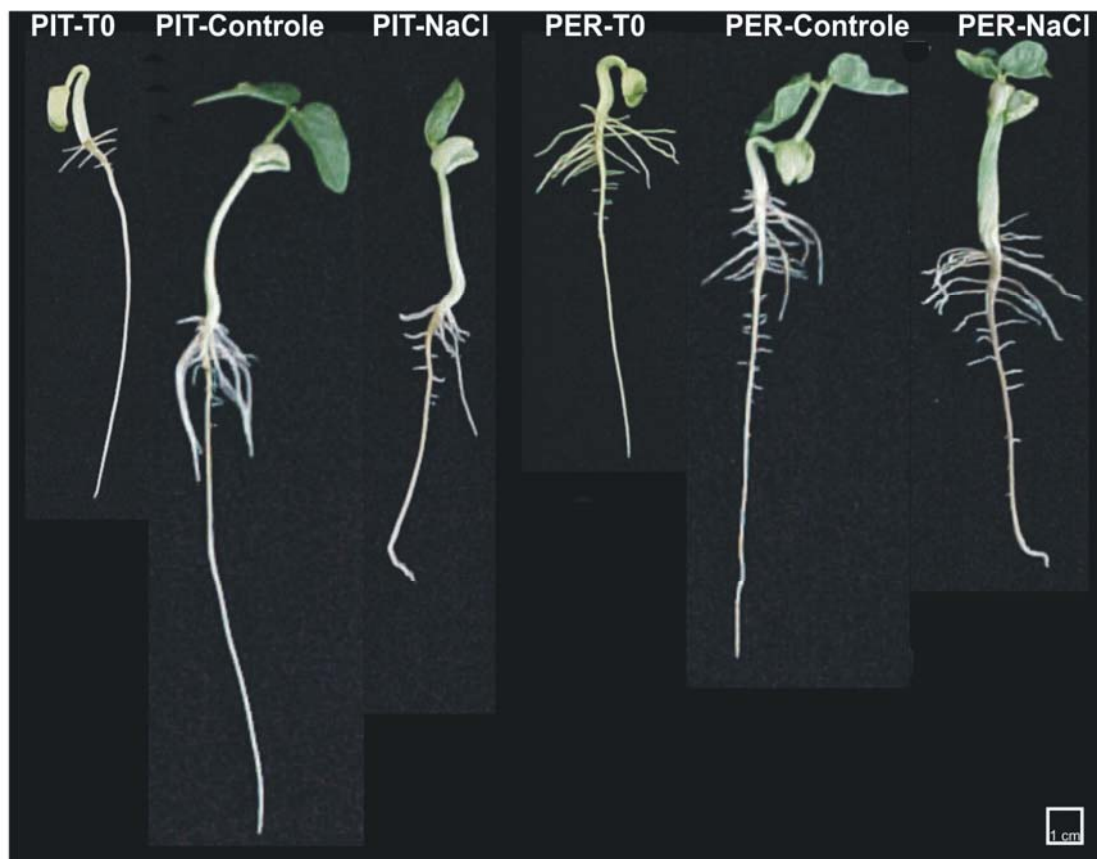


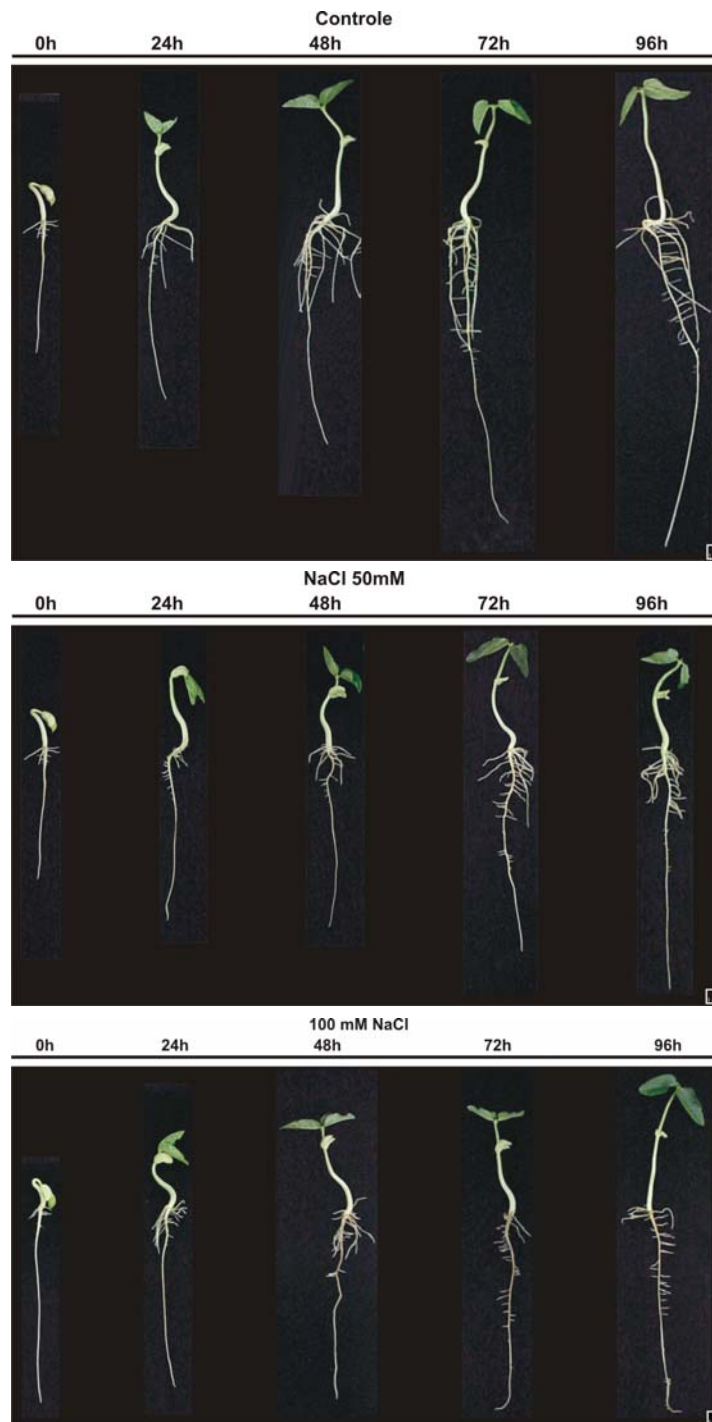
Figura 1 – O Na^+ pode induzir (indiretamente) a atividade dos canais de cálcio (CC) e da oxidase de NADPH (NOX). O cálcio intracelular também estimula a atividade de NOX. Esta enzima produz $\text{O}_2^{\bullet -}$ que é convertido a H_2O_2 por uma dismutase de superóxido (SOD) apoplástica. O H_2O_2 apoplástico pode ser degradado por uma peroxidase de parede celular (POX) que participa do processo de lignificação, oxidando fenóis apoplásticos ($\text{X} \rightarrow \text{X}^\bullet$). O ácido ascórbico (Asc.) é degradado por uma oxidase de ascorbato (AO) e seus subprodutos podem gerar H_2O_2 . Esta molécula também pode ser internalizada e ser utilizada em outros processos metabólicos. A inibição da atividade de catalase (CAT) e peroxidase de ascorbato (APX) pode ser requerida para manter os níveis de H_2O_2 intracelular.



Anexo 1 – Aspecto morfológico das plântulas de feijão-caupi, cultivares Pitiúba (PIT-esquerda) e Pérola (PER-direita) do capítulo 2. T0 – aspecto das plântulas com 4 dias após semeio (antes da aplicação do tratamento); Controle – plântulas não-tratadas após 2 dias de tratamento; NaCl – plântulas tratadas com 100 mM de NaCl após 2 dias de tratamento.



Anexo 2 – Aspecto morfológico das plântulas de feijão-caupi, cultivares Pérola (acima) e Pitiúba (abaixo) do capítulo 3. T0 – aspecto das plântulas com 4 dias após semeio (antes da aplicação do tratamento); 0, 25, 50, 75 e 100 correspondem aos tratamentos de NaCl (em mmol L^{-1}) aplicados durante 2 dias em ambos os cultivares.



Anexo 3 – Aspecto morfológico das plântulas de feijão-caupi, cultivar Pitiúba do capítulo 4. T0 – aspecto das plântulas com 4 dias após semeio (antes da aplicação do tratamento); 0, 24, 48, 72 e 96 horas correspondem aos tempos de exposição às doses de NaCl 0 mM (A), 50 mM (B) e 100 mM (C).