

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA e BIOLOGIA MOLECULAR**

**FRANKLIN ARAGÃO GONDIM**

**EFEITOS DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A GERMINAÇÃO E  
NA ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS DE MILHO À SALINIDADE**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**- 2008 -**

**FRANKLIN ARAGÃO GONDIM**

**EFEITOS DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A GERMINAÇÃO E  
NA ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS DE MILHO À SALINIDADE**

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos necessários para obtenção do grau  
de Mestre em Bioquímica, outorgado pela  
Universidade Federal do Ceará.

**ORIENTADOR:**  
**ENÉAS GOMES FILHO**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**- 2008 -**

G529e Gondim, Franklin Aragão

Efeitos do peróxido de hidrogênio sobre a germinação e na aclimação de plantas de milho à salinidade [manuscrito] / Franklin Aragão Gondim  
116 f. : il. color. ; enc.

Orientador: Prof. Dr.Enéas Gomes Filho

Co-orientador: Prof. Dr.Claudivan Feitosa de Lacerda

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Fortaleza, 2008

1. Zea mays 2. Enzimas antioxidativas 3. Estresse salino 4. Pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> I. Gomes Filho, Enéas (orient.) II. Lacerda, Claudivan Feitosa de (co-orient.) III.Universidade Federal do Ceará – Mestrado em Bioquímica IV.Título

CDD 574.192

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho dessa dissertação é permitida desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

---

Franklin Aragão Gondim

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM:** \_\_/\_\_/2008

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda (Co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

FORTALEZA-CE

2008

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa a mim concedida, bem como pelo auxílio financeiro às pesquisas do Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Aos professores e funcionários dos departamentos de Biologia e Bioquímica e Biologia Molecular, que direta ou indiretamente auxiliaram na minha formação científica.

Ao professor Enéas Gomes Filho pela fundamental orientação, amizade, confiança e incentivo à minha formação.

Aos professores Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda pela excelente co-orientação, ao Dr. André Dias de Azevedo Neto pelas valiosas sugestões e ao Dr. João Bosco Pitombeira por ter gentilmente fornecido as sementes de milho.

Aos meus pais, Sérgio Roberto Porto Gondim e Maria Aurini Aragão Gondim, pelo esforço, educação, incentivo, companheirismo, sabedoria e compreensão.

Aos meus avós que sempre se fizeram presentes, em especial à minha segunda mãe, Leonília Aragão e ao meu avô Ferdinand Gondim que, com certeza, me deu forças lá de cima.

Ao meu irmão, André Gondim, pelo apoio e amizade.

A Janaina Chávez, pelo companheirismo e compreensão.

Aos demais componentes do grupo de Fisiologia Vegetal: Prof. Dr. José Tarquínio Prisco, Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho, Dr. Marlos Alves Bezerra, Dr. Francisco Valderez, Aiala Amorim, Aldo Cirino, Alexcyane Feijão, Aline Neris, Ana Raquel, Carlos Eduardo, Élton Marques, Fabrício Sudério, Gislayne Karla, Jand-Venes, Juan Carlos, Júlio César, Michella

Albuquerque, Nara Lúdia, Paulo André, Paulo Henrique, Raimundo Wesley, Sidney Praxedes, Thalita Montoril, Valdinéia Soares e Viviane Pinho pela ajuda, amizade e convivência.

A todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na conquista desse objetivo. Em especial, aos meus colegas dos Cursos de Ciências Biológicas e Mestrado em Bioquímica da UFC.

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

## RESUMO

GONDIM, F. A. **Efeitos do peróxido de hidrogênio sobre a germinação e na aclimação de plantas de milho à salinidade.** UFC. 116p. (Dissertação)\*

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) sobre a germinação e a aclimação de plantas de milho ao estresse salino, estudando os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos. Nos experimentos, em número de três, foi utilizado o híbrido triplo de milho (*Zea mays* L), o BRS 3003. No primeiro experimento, foram avaliados os efeitos do  $H_2O_2$  na germinação das sementes de milho; no segundo, foram avaliados os efeitos do pré-tratamento de embebição das sementes de milho com  $H_2O_2$  nas atividades das enzimas e isoenzimas antioxidativas e, no terceiro, foram avaliados os efeitos do pré-tratamento de sementes de milho com  $H_2O_2$  sobre a aclimação das plantas de milho à salinidade e os mecanismos possivelmente envolvidos. No primeiro experimento, o qual foi realizado em sala de germinação, observou-se que o  $H_2O_2$  na concentração de 100 mM acelerou o processo de germinação das sementes de milho, o mesmo não ocorrendo na concentração de 500 mM. No segundo experimento, o qual também foi realizado em sala de germinação, observou-se que o pré-tratamento das sementes induziu forte aumento nas atividades das enzimas peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT), desde o tempo de embebição de 30 h das sementes com  $H_2O_2$ . Já com relação à peroxidase do guaiacol (GPX), observou-se que a atividade dessa enzima foi menor nas sementes embebidas com  $H_2O_2$  nos tempos de 12, 24, 30, 36 e 42 h, em relação àquelas embebidas em água destilada (controle), porém, nas pré-tratadas por um tempo de 48 h não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. A dismutase do superóxido (SOD), por sua vez, não foi afetada pelo pré-tratamento das sementes, exceto no tratamento de embebição das sementes com  $H_2O_2$  por 24 h. Nas sementes, foi detectada apenas uma isoenzima de CAT e seis de SOD. O pré-tratamento das sementes não provocou alterações nessas isoformas, exceto com relação à intensidade da banda de atividade da CAT visualizada no gel de poliacrilamida, que se mostrou muito superior àquela do controle, quando as sementes foram embebidas por 36 e 48 h com  $H_2O_2$ . É possível que os aumentos nas

---

\***Orientador:** Prof. Enéas Gomes Filho. **Membros da Banca:** Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda e Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto.



atividades da APX e, especialmente, da CAT, tenham sido responsáveis pela aceleração do processo de germinação. No terceiro experimento, o qual foi conduzido inicialmente em Sala de germinação e, em seguida, em casa de vegetação, foram utilizadas sementes de milho pré-tratadas por 36 h de embebição em solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM ou em água destilada. Essas sementes foram postas para germinar em folhas de papel de filtro umedecidas com solução nutritiva em presença ou ausência de NaCl a 80 mM em sala de germinação. Decorridos seis dias, as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação e cultivadas hidronicamente em presença ou ausência de NaCl a 80 mM, sendo feitas coletas das plantas aos 6, 11 e 16 dias de idade. Como resultado, observou-se que o pré-tratamento das sementes com  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziu a aclimação das plantas à salinidade, reduzindo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade na produção de matéria e na área foliar. Esse resultado pode ser atribuído, pelo menos em parte, a uma maior eficiência do sistema antioxidativo das plantas oriundas de sementes pré-tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A CAT, que se mostrou a principal enzima eliminadora de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , teve sua atividade nas folhas fortemente reduzida pela salinidade, nas plantas com seis dias de idade, sendo este efeito totalmente revertido nas plantas provenientes de sementes pré-tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por outro lado, nas raízes das plantas submetidas ao estresse salino, a atividade da SOD foi estimulada pelo pré-tratamento das sementes com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nos três tempos de coleta. De modo geral, a salinidade reduziu os parâmetros fotossintéticos (condutância estomática, transpiração, fotossíntese e concentração interna de  $\text{CO}_2$ ) e o pré-tratamento das sementes não foi capaz de reverter esse efeito. Não foi possível estabelecer-se uma correlação precisa entre os teores de solutos orgânicos e o processo de aclimação das plantas pré-tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  à salinidade, em termos de ajustamento osmótico. No entanto, os menores valores da razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  nas raízes e, especialmente, nas folhas das plantas pré-tratadas e submetidas à salinidade, em relação àquelas oriundas de sementes pré-tratadas com água (controle) e submetidas a esse mesmo tratamento, aos 16 dias de idade, pode também ter sido um fator responsável, pelo menos em parte, pela aclimação das plantas de milho à salinidade.

**Palavras-chave:** Enzimas antioxidativas, estresse salino, germinação, pré-tratamento de sementes com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , solutos orgânicos e inorgânicos, trocas gasosas, *Zea mays*.

---

## ABSTRACT

GONDIM, F. A. **Hydrogen peroxide effects on the germination and the acclimation of maize plants subjected to salinity**. UFC. 116 p. (M. S. Dissertation)\*

The aim of this work was to evaluate the effects of the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) on germination and acclimation of maize plants subject to the saline stress, in order to better understand the physiological and biochemical mechanisms involved. In the three experiments the triple hybrid of maize (*Zea mays* L) BRS 3003 was used. In the first experiment, the effects of  $H_2O_2$  on germination of the maize seeds were evaluated; in the second, the effects of pre-treating by soaking maize seeds in  $H_2O_2$  solution on the activities of antioxidative enzymes and isoenzymes; and as, the effects of the pre-treatment of maize seeds with  $H_2O_2$  on acclimation of the plants to salinity and the possible mechanisms involved with this process. In the first experiment, which was carried out in a growth room,  $H_2O_2$  accelerated the germination rate of maize seeds at 100 mM, but, not at 500 mM. In the second experiment, also carried out in growth room, it was observed that the pre-treatment of the seeds induced a pronounced increase in the activities of the enzymes ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), after 30 h of soaking in  $H_2O_2$ . It was also observed that the activity of the Guaiacol peroxidase (GPX) was smaller in the seeds soaked in  $H_2O_2$  for 12, 24, 30, 36 and 42 h, in relation to those soaked in distilled water (control). However,  $H_2O_2$  treatment for 48 h showed no significant differences as compared with control. The superoxide dismutase (SOD) activity was not affected by the pre-treatment of the seeds, except for the 24 h treatment. In the seeds, it was detected only one isoform of CAT and six of SOD. The pre-treatment of the seeds did not cause great changes in those isoforms, except for the intensity of the band of activity of CAT visualized in the polyacrylamide gel, which was very superior to that of the control, when the seeds were soaked by 36 and 48 h with  $H_2O_2$ . The increases in the activities of APX and, especially, of CAT, could be associated with the acceleration of the germination process. In the third experiment, which was carried out initially at growth room and, later, at the glasshouse, maize seeds were pre-treated for 36 h by soaking in solution of  $H_2O_2$  100 mM or in distilled water. Those seeds were germinated on filter paper

---

\***Orientador:** Prof. Enéas Gomes Filho. **Membros da Banca:** Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda e Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto.

moistened with nutrient solution in the presence or absence of NaCl 80 mM, in a growth room. After six days, the seedling were transferred to the glasshouse and cultivated in trays containing only nutrient solution (control treatment) or nutrient solution with NaCl at 80 mM. Plants were harvest with 6, 11 and 16 days old. The results showed the pre-treatment of the seeds with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced acclimation of the plants to the salinity. It decreased the deleterious effects of salt stress on the growth (biomass production and leaf area) of maize. This fact was associated with a higher efficiency of the antioxidative system of plants pre-treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CAT was the most important among the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes in leaves, but, its activity was strongly reduced by salinity in plants 6 and 11 days old, however, this effect was totally reverted in the stressed plants originated from seeds pre-treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On the other hand, in the roots of plants submitted to saline stress, the activity of SOD was stimulated by the pre-treatment of the seeds with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in the three periods of harvest. In general, salinity reduced the photosynthetic parameters (stomatal conductance, net CO<sub>2</sub> assimilation rate, transpiration and intracellular CO<sub>2</sub> concentration) and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-treatment of seeds was not capable to revert that effect. In terms of osmotic adjustment, the contents of organic solutes were not positively correlated to the process of acclimation to salt stress of the plants pre-treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the salinity. However, the smallest values of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio in roots and in leaves were found for the pre-treated plants submitted to salinity, when compared to those originated from of seeds pre-treated with water (control) and submitted to that same treatment, and it may also be a responsible factor for the acclimation of the maize plants to the salinity.

**Keywords:** Antioxidative enzymes, salt stress, germination, pre-treatment of seeds with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, organic and inorganic solutes, gas exchange, *Zea mays*.

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b>	Via de redução monovalente do $O_2$ à $H_2O_2$ .....	24
<b>Figura 2.</b>	Ciclo do ascorbato-glutationa.....	28
<b>Figura 3.</b>	Visão geral do experimento mostrando plântulas em casa de vegetação sob condições hidropônicas.....	51
<b>Figura 4.</b>	Porcentagem de germinação de sementes de milho semeadas em água destilada e em presença de $H_2O_2$ a 100 mM ou 500 mM em função do tempo.....	53
<b>Figura 5.</b>	Atividades das enzimas catalase, peroxidase do ascorbato, peroxidase do guaiacol e dismutase do superóxido em sementes de milho.....	55
<b>Figura 6.</b>	Atividade da catalase em gel de poliacrilamida em sementes de milho embebidas por 12, 36 e 48 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	59
<b>Figura 7.</b>	Atividade da dismutase do superóxido em gel de poliacrilamida em sementes de milho embebidas por 12, 36 e 48 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	60
<b>Figura 8.</b>	Plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	62
<b>Figura 9.</b>	Matérias secas da parte aérea, das raízes e total de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	63
<b>Figura 10.</b>	Área foliar de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	66
<b>Figura 11.</b>	Condutância estomática, fotossíntese líquida, taxa de transpiração e concentração interna de $CO_2$ de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	68

<b>Figura 12.</b> Teores relativos de clorofila de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	71
<b>Figura 13.</b> Atividade da dismutase do superóxido em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	73
<b>Figura 14.</b> Atividade da dismutase do superóxido em gel de poliacrilamida em folhas de plantas de milho crescendo sob condições controle ou salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	75
<b>Figura 15.</b> Atividade da dismutase do superóxido em gel de poliacrilamida em raízes de plantas de milho crescendo sob condições controle ou salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	77
<b>Figura 16.</b> Atividade da catalase em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	79
<b>Figura 17.</b> Atividade da catalase em gel de poliacrilamida em folhas de plantas de milho crescendo sob condições controle ou salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	81
<b>Figura 18.</b> Atividade da peroxidase do guaiacol em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	83
<b>Figura 19.</b> Atividade da peroxidase do ascorbato em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em $H_2O_2$ a 100 mM.....	86

<b>Figura 20.</b> Teores de proteína em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 mM.....	88
<b>Figura 21.</b> Teores de carboidratos solúveis em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 mM.....	91
<b>Figura 22.</b> Teores de N-aminossolúveis em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 mM.....	93
<b>Figura 23.</b> Teores de prolina em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 mM.....	95
<b>Figura 24.</b> Teores de Na <sup>+</sup> em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 mM.....	98
<b>Figura 25.</b> Teores de K <sup>+</sup> em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 mM.....	100
<b>Figura 26.</b> Razão entre os teores de Na <sup>+</sup> e de K <sup>+</sup> em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 mM.....	102
<b>Figura 27.</b> Teores de Cl <sup>-</sup> em folhas e raízes de plantas de milho sob condições controle e salinas, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água ou em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 mM.....	104

## **SUMÁRIO**

<b>RESUMO .....</b>	<b>07</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1. Justificativa .....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
2.1. Solos salinos.....	20
2.2. Efeitos da salinidade sobre o crescimento das plantas.....	21
2.3. As espécies reativas de oxigênio e o metabolismo.....	23
2.4. As enzimas do sistema antioxidativo.....	25
2.5. Ajustamento osmótico.....	29
2.6. Tolerância das plantas à salinidade.....	29
2.7. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.....	30
2.8. A germinação e as espécies reativas de oxigênio (ROS).....	32
2.9. A cultura do milho.....	34
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1. Gerais.....	37
3.2. Específicos.....	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
4.1. Experimento I - Efeito do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na percentagem de germinação de sementes de milho.....	38
4.2. Experimento II - Efeitos da embebição de sementes de milho com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre a atividade enzimática e nos padrões eletroforéticos de isoenzimas antioxidativas...	39

4.2.1. Preparação do extrato de sementes.....	39
4.2.2. Atividade enzimática em sementes de milho.....	40
4.2.2.1. Dismutase do superóxido.....	40
4.2.2.2. Catalase.....	40
4.2.2.3. Peroxidase do ascorbato.....	41
4.2.2.4. Peroxidase do guaiacol.....	41
4.2.3. Padrões eletroforéticos das isoenzimas de CAT e SOD em sementes de milho.....	42
4.3. Experimento III - Efeito do pré-tratamento de sementes de milho com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre a aclimação e a fisiologia e bioquímica das plantas sob condições de estresse salino.....	43
4.3.1. Coleta do material e medidas de crescimento.....	45
4.3.2. Trocas gasosas e teores relativos de clorofila.....	45
4.3.3. Preparação dos extratos de folhas e raízes.....	46
4.3.4. Atividades enzimáticas em folhas e raízes.....	46
4.3.5. Padrões eletroforéticos das isoenzimas de CAT e SOD em folhas e raízes de plantas de milho.....	47
4.3.6. Determinação de proteínas solúveis e solutos orgânicos em folhas e raízes.....	47
4.3.6.1. Proteínas solúveis.....	47
4.3.6.2. Carboidratos solúveis.....	48
4.3.6.3. N-aminossolúveis.....	48
4.3.6.4. Prolina.....	49
4.3.7. Determinação dos teores de solutos inorgânicos em folhas e raízes.....	49
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
5.1. Experimento I - Efeito do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na percentagem de germinação de sementes de milho.....	52
5.2. Experimento II - Efeito da embebição de sementes de milho com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre a atividade enzimática e nos padrões eletroforéticos de isoenzimas do sistema antioxidativo.....	54
5.2.1. Atividade enzimática.....	54



5.2.2. Padrões eletroforéticos de isoenzimas de CAT e de SOD em sementes.....	58
5.3. Experimento III - Efeito do pré-tratamento de sementes de milho com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre a aclimação e a fisiologia e bioquímica das plantas sob condições de estresse salino.....	61
5.3.1. Crescimento das plantas.....	61
5.3.2. Trocas gasosas e medidas de clorofila.....	67
5.3.3. Atividades enzimáticas em folhas e raízes.....	72
5.3.3.1. Atividade da dismutase do superóxido.....	72
5.3.3.1.2. Padrões eletroforéticos de isoenzimas de SOD.....	74
5.3.3.2. Atividade da catalase.....	78
5.3.3.2.1. Padrões eletroforéticos de isoenzimas de CAT.....	80
5.3.3.3. Atividade da GPX.....	82
5.3.3.4. Atividade da APX.....	85
5.3.4. Solutos orgânicos.....	87
5.3.4.1. Proteínas solúveis.....	87
5.3.4.2. Carboidratos solúveis.....	90
5.3.4.3. N-aminossolúveis.....	92
5.3.4.4. Prolina.....	94
5.3.5. Solutos inorgânicos.....	97
 <b>6. CONCLUSÕES .....</b>	 106
 <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	 107

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Justificativa

A salinidade é um dos estresses abióticos que mais afeta o crescimento e a produtividade das plantas em todo o mundo (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003; VEERANAGAMALLAIAH *et al.*, 2007), ocorrendo nas áreas irrigadas como nas não irrigadas. A maioria das áreas afetadas pela salinidade ou pela sodicidade, ocorre naturalmente. Entretanto, uma proporção significativa de áreas cultiváveis tem se tornado salina em virtude de retiradas da vegetação e irrigações com águas salinas (MUNNS, 2005).

Dados da FAO, do ano de 2000, mostram que dos 1500 milhões de hectares das terras agricultáveis do mundo sob condições de sequeiro, 32 milhões (2%) estavam afetados pela salinidade em variados graus. Além disso, dos 230 milhões de hectares de terras irrigadas no mundo, 45 milhões encontravam-se salinizadas, trazendo sérios prejuízos para a produção agrícola, principalmente para as regiões áridas e semi-áridas, onde cerca de 25% das terras irrigadas já se encontravam salinizadas (FAO, 2000). Apesar das terras irrigadas corresponderem a apenas 15% da área mundial agricultável, essas apresentam produtividade duas vezes superior às da agricultura de sequeiro, e são responsáveis por um terço da produção mundial de alimentos (MUNNS, 2005). No Brasil, esse problema está concentrado, principalmente, nos perímetros irrigados do Nordeste, e se deve ao manejo inadequado do solo e da água, associado com as elevadas taxas de evapotranspiração e baixas precipitações pluviométricas, características dessa região (FAGERIA; GHEYI, 1997). Esse problema de salinização é freqüente na região Nordeste do Brasil, tendo em vista que esta possui uma área de 155 milhões de hectares, sendo 52% dessa superfície semi-árida (LIRA *et al.*, 1982). Estudos mostram que nos perímetros irrigados do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) localizados na região Nordeste do

Brasil, em média, 12% da área agrícola útil foram desativadas pelo excesso de sais enquanto que 7,6% já estavam salinizados (GHEYI, 2000).

A utilização de cultivares tolerantes à salinidade constitui-se uma alternativa viável e complementar aos usuais sistemas de correção dos solos visando a produção vegetal sob condições salinas. Apesar da constatada existência de variabilidade genética entre espécies e entre cultivares de uma mesma espécie, fato que torna possível o melhoramento genético para a tolerância à salinidade, bem como os avanços da engenharia genética, poucos são os exemplos de obtenção de cultivares tolerantes à salinidade (ZHU, 2001). A seleção de genótipos tolerantes à salinidade, por meio de melhoramento genético clássico, não tem obtido os efeitos desejados por falta de conhecimentos sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos com o processo de adaptação das plantas ao estresse (NOBLE; ROGERS, 1992).

Atualmente, é possível conseguir-se plantas transgênicas que sejam tolerantes à salinidade fazendo-se o uso da tecnologia do DNA recombinante (ZHANG; BLUMWALD, 2001; APSE; BLUMWALD, 2002). Uma grande variedade de ferramentas moleculares que possibilita a manipulação genética de plantas tem se tornado disponível. Entretanto, a aplicação dessas novas tecnologias para introdução de genes que conferem tolerância a estresses em plantas não tem sido utilizadas em larga escala (MUNNS, 2005). Atribui-se à falta de conhecimentos sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados com a tolerância à salinidade como sendo o principal fator responsável pelo lento progresso nessa área. Portanto, o estudo dos supracitados mecanismos torna-se relevante.

O processo de aclimação a determinadas condições de estresse se constitui numa alternativa para aumentar a capacidade das plantas de sobreviverem a condições adversas. A aclimação consiste em um processo no qual a exposição prévia de um indivíduo a um

determinado tipo de estresse, provoca mudanças metabólicas, que são responsáveis pelo aumento de sua tolerância a uma nova exposição ao estresse. Quando essa exposição prévia é feita com um estresse diferente do segundo (estresse definitivo), diz-se que essa aclimação induziu uma tolerância cruzada (NEIL *et al.*, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004). Nesses processos, as plantas sofrem modificações fisiológicas temporárias que podem envolver a expressão gênica, mas que não são transmitidas de uma geração para outra. Dentre os processos de aclimação ao estresse salino, o do pré-tratamento das plantas com pequenas quantidades de  $H_2O_2$  tem se mostrado promissor. Uchida *et al.* (2002), trabalhando com arroz e Azevedo Neto *et al.* (2005), com milho, observaram que o pré-tratamento das plântulas com  $H_2O_2$  em solução nutritiva induziu aclimação das plantas à salinidade. Contudo, não há informações se o pré-tratamento das sementes de milho com esta substância também é capaz de induzir aclimação das plantas ao estresse salino, visto que se trata de um sistema mais simples, de baixo custo e de fácil utilização pelos produtores.

O milho é uma espécie tradicionalmente cultivada em todo o Brasil, servindo tanto para a alimentação humana como animal, representando mais de 1/3 da produção nacional de cereais e oleaginosas (BULL, 1993). É uma cultura considerada moderadamente sensível à salinidade sofrendo, a partir de  $1,6 \text{ dS.m}^{-1}$ , redução de 7,4% na produção de matéria seca por unidade de incremento de condutividade elétrica, embora esse efeito difira entre os cultivares (MASS, 1993). Portanto, dada a importância econômica do milho e sua relativa sensibilidade aos sais, o estudo da fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas de milho oriundas de sementes pré-tratadas com  $H_2O_2$  torna-se relevante.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Solos salinos

De acordo com Richards (1954), um solo é considerado salino quando apresenta condutividade elétrica do extrato de saturação superior a  $4,0 \text{ dS.m}^{-1}$ . Contudo, segundo Chinnusamy *et al.* (2005), a grande maioria dos vegetais cultiváveis é susceptível à salinidade mesmo quando o extrato de saturação do solo apresenta-se menor que  $3,0 \text{ dS.m}^{-1}$ . De forma mais simples, Veeranagamallaiah *et al.* (2007), definem salinidade como a ocorrência de sais no solo e/ou na água de irrigação em concentrações capazes de prejudicar o crescimento das plantas.

Na maioria dos solos salinos, os principais íons encontrados são os cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e os ânions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  (OLIVEIRA, 1997). Porém, também são encontrados, com menor frequência, os íons  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{K}^+$  (RICHARDS, 1954). A salinização dos solos pode ter origem natural ou artificial. Dentre os fatores naturais destaca-se a intemperização química dos minerais e rochas da crosta terrestre, a qual é responsável pela liberação e distribuição dos íons (DAKER, 1976). Também a presença de íons na água do mar é um fator que contribui para o processo de salinização natural (AYERS; WESTCOT, 1991). Já os fatores artificiais podem ter origem antrópica, devido ao manejo inadequado do solo e da água, especialmente nos sistemas de cultivo irrigados (AYERS; WESTCOT, 1991). Para Ashraf e Foolad (2007), a baixa precipitação pluviométrica, a elevada superfície evaporativa, a irrigação com águas salinas e as inadequadas práticas agrícolas aplicadas nas culturas estão entre os principais fatores que têm contribuído para o aumento da salinidade nos solos.

## **2.2. Efeitos da salinidade sobre o crescimento das plantas**

O problema da salinidade tem sido alvo de muitas pesquisas em virtude do sal inibir o crescimento das plantas em grandes áreas do globo. Em um meio com altas concentrações de sais, há um desequilíbrio no gradiente de potencial hídrico entre o solo e a planta, modificando a distribuição dos íons tanto a nível celular como entre os vários órgãos da planta (ZHU, 2001).

A inibição do crescimento pode ser devida aos efeitos osmóticos dos sais, diminuindo a disponibilidade de água na solução do solo, e/ou ao excesso de íons absorvidos pela planta, causando efeitos tóxicos ao metabolismo, sendo tais efeitos o que separa claramente as espécies e genótipos que diferem na tolerância ou sensibilidade à salinidade (MUNNS, 2002). De acordo com Munns (2005), a redução do crescimento das plantas simplesmente pelos efeitos osmóticos da salinidade, denomina-se fase 1, enquanto a fase 2 é aquela em que o excesso de sais causa injúrias às células das folhas das plantas, atingindo tais órgãos através do fluxo transpiratório.

A fase 1 da salinidade ocorre devido ao excesso de sais que se encontra fora da planta, e mostra-se extremamente semelhante, do ponto de vista metabólico e celular, ao que ocorre em plantas sob estresse hídrico. Na fase 2 da salinidade, os efeitos no crescimento são oriundos dos sais que se encontram no interior da planta. Nesse caso, os sais se apresentam em concentração superior à capacidade das células de compartimentalizá-los no vacúolo e ficam dispersos pelo citoplasma inibindo a atividade de algumas enzimas (MUNNS, 2005).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na tolerância das plantas à salinidade é bastante complexo, pois depende de vários genes, os quais codificam para diferentes proteínas relacionadas ao estresse salino, tais como: enzimas relacionadas com a síntese de solutos compatíveis; enzimas vacuolares e responsáveis pela compartimentalização de íons e enzimas

removedoras de espécies reativas de oxigênio (PARIDA; DAS, 2005). Além disso, as respostas das plantas à salinidade podem variar em função de fatores intrínsecos da planta (genótipo e estágio de desenvolvimento), de fatores relacionados ao estresse (composição salina do meio, intensidade, duração e forma de aplicação do estresse) e de fatores ambientais (luz, temperatura e umidade relativa do ar), bem como da interação entre estes (NEUMANM, 1997; BRAY *et al.*, 2000).

O crescimento vegetativo das plantas é impulsionado pelo estado de energia livre das moléculas de água, denominado potencial hídrico, e é resultante da interação entre o potencial de pressão e o potencial osmótico das células (XIONG; ZHU, 2002). A água, como se sabe, é de fundamental importância, pois é o meio onde ocorrem as atividades bioquímicas de todas as formas de vida conhecidas. Para as células vegetais, ela desempenha, também, a importante função de proporcionar a pressão de turgescência necessária para que ocorra a expansão celular (XIONG; ZHU, 2002). O crescimento das plantas é resultado direto da expansão de células jovens oriundas de divisões meristemáticas e, tanto em raízes como em folhas, essa expansão pode ser inibida pela salinidade (NEUMANN, 1997; ZHU, 2001). Altos níveis de sais em folhas maduras de muitas variedades sensíveis ao estresse salino conduzem a efeitos tóxicos que aceleram a senescência e ou necrose foliar, reduzindo a área foliar disponível para a fotossíntese, bem como os níveis de hormônios essenciais para o crescimento (NEUMANN, 1997). Além disso, a fotossíntese líquida pode ser afetada pelo fechamento estomático precoce, que visa prevenir a perda excessiva de água através da transpiração (GRENNWAY; MUNNS, 1980). Costa *et al.* (2003), trabalhando com plantas de feijão-de-corda, crescendo em solução nutritiva a 75 mM de NaCl, constataram reduções na área foliar e na matéria seca das raízes e partes aéreas dos diferentes cultivares estudados. Ressalte-se que a elevada salinidade no ambiente radicular

pode ocasionar, além de estresse hídrico e desequilíbrio iônico, o surgimento secundário de patologias nas plantas (ZHU, 2001).

### 2.3. As espécies reativas de oxigênio e o metabolismo

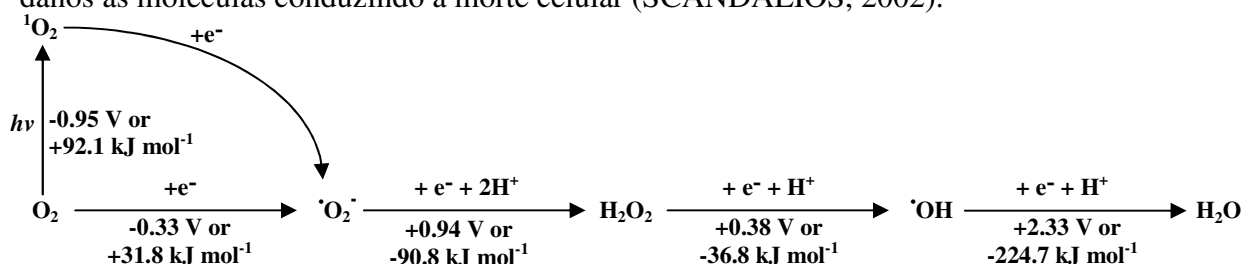
Um dos eventos bioquímicos que ocorrem nas plantas é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), as quais são geradas durante o metabolismo celular normal, mas cuja produção pode ser aumentada em condições de estresse. As ROS mais comumente encontradas são o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais superóxido ( $\cdot O_2^-$ ) e hidroxil ( $\cdot OH$ ). Essas espécies são produzidas no metabolismo aeróbico normal durante o fluxo de elétrons na mitocôndria e cloroplasto quando os transportadores de elétrons reduzidos reagem parcialmente com o  $O_2$  na ausência de outros aceptores de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; THOMPSON *et al.*, 1987). O  $H_2O_2$  também pode ser produzido no citosol, na membrana plasmática e na matriz extracelular por várias oxidases e peroxidases de parede celular (ŚLESIAK, *et al.*, 2007). A mais estudada delas, é a NADPH oxidase localizada na membrana plasmática, a qual catalisa a redução do  $O_2$  pelo NADPH citosólico formando o radical  $\cdot O_2^-$  que, por sua vez, pode ser convertido em  $H_2O_2$  no apoplasto espontaneamente ou pela atividade da enzima dismutase do superóxido (BOLWELL *et al.*, 2002; APEL; HIRT, 2004).

As ROS são metabólitos importantes e estão envolvidas com os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como de apoptose e de senescência celular (FINKEL, 2003). Tradicionalmente, tais espécies químicas foram consideradas produtos tóxicos do metabolismo



aeróbico, entretanto, estudos recentes mostram que as plantas produzem essas espécies e que as mesmas agem como moléculas sinalizadoras para controlar os diferentes processos celulares (MITTLER, 2002).

Nos organismos aeróbios, a redução de uma molécula de  $O_2$  até duas de  $H_2O$  requer quatro elétrons. Se essa redução ocorresse com a transferência de pares de elétrons, a única ROS formada seria o  $H_2O_2$ , o qual é um intermediário relativamente estável. Entretanto, na via de redução monovalente, além do  $H_2O_2$ , há a formação de outras ROS, tais como os radicais  $\cdot O_2^-$  e  $\cdot OH$  (Figura 1). O radical  $\cdot OH$  pode também ser originado da interação entre o  $\cdot O_2^-$  e o  $H_2O_2$  na presença de íons metálicos. Os radicais  $\cdot O_2^-$  e  $\cdot OH$  são extremamente reativos e podem causar danos às moléculas conduzindo à morte celular (SCANDALIOS, 2002).



**Figura 1.** Via de redução monovalente do  $O_2$  à  $H_2O$ . Os números indicam o potencial de oxidorredução aproximado (em volts) ou a variação de energia livre padrão (em  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) (AZEVEDO NETO *et al.*, 2008).

O oxigênio singlete ( ${}^1O_2$ ) apresenta-se mais reativo do que o  $O_2$  e é formado quando este último absorve energia suficiente para reverter o spin de um de seus elétrons desemparelhados (Figura 1). Na via de redução monovalente, o  $O_2$  recebe elétrons dos metais de transição e radicais orgânicos, resultando uma sequência de formação das ROS, tendo como produto final a molécula de água (Figura 1). O primeiro passo da via é dependente de energia (processo

endergônico) enquanto que os demais são exergônicos e podem ocorrer espontaneamente usando metais de transição ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) e semiquinonas como doadores de elétrons (AZEVEDO NETO *et al.*, 2008).

Há evidências de que as ROS têm a produção aumentada quando as plantas são submetidas a estresses bióticos ou abióticos (MØLLER *et al.*, 2007). As ROS, quando em excesso, podem ter efeitos prejudiciais sobre o metabolismo das plantas, ocasionando danos oxidativos às proteínas, ácidos nucleicos e lipídios essenciais para a estrutura das membranas (NOCTOR; FOYER, 1998; MØLLER *et al.*, 2007). Além disso, atribui-se ao superóxido e ao peróxido de hidrogênio a habilidade de iniciar cascatas de reações que conduzem à produção do radical hidroxil e de outras espécies destrutivas (VRANOVÁ *et al.*, 2002).

#### **2.4. As enzimas do sistema antioxidativo**

Os efeitos nocivos das ROS nas plantas podem ser reduzidos ou eliminados através de sistema enzimático e não enzimático de defesa (ASADA, 1999). O primeiro é formado por uma grande variedade de enzimas, tais como: dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases do guaiacol (GPX) e do ascorbato (APX) e outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (redutase do monodesidroascorbato, MDHAR, redutase do desidroascorbato, DHAR, e a redutase da glutathione, GR). Por outro lado, o sistema não-enzimático é formado por antioxidantes de baixa massa molecular, principalmente, ascorbato e glutathione reduzida (APSE; BLUMWALD, 2002; CHINNUSAMY *et al.*, 2005).

A SOD catalisa a conversão do  $\cdot\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  e oxigênio molecular. O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por sua vez, também apresenta toxicidade e deve ser eliminado, o que é feito pelas enzimas CAT, GPX e APX

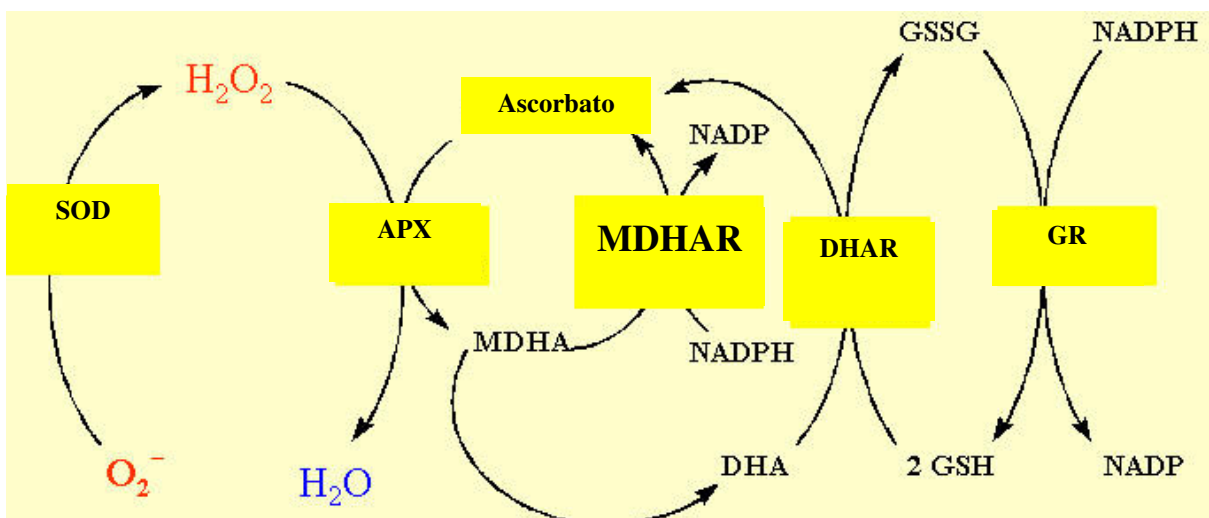
(POLLE, 2001; VAIDYANATHAN *et al.*, 2003). A SOD está presente em todos os organismos aeróbicos em compartimentos subcelulares que geram oxigênio ativado, e tem sido evidenciado que ela apresenta um papel central na defesa contra o estresse oxidativo (McKERSIE; LESHEM, 1994). São conhecidos três distintos tipos de SOD de acordo com os cofatores metálicos que utilizam: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD (BANNISTER *et al.*, 1997). Scandalios (2002), afirma que existe ainda um quarto tipo de SOD, cujo cofator metálico é o níquel (Ni). A Cu/Zn-SOD é encontrada nos cloroplastos e no citosol, a Mn-SOD, é, geralmente, encontrada na mitocôndria e a Fe-SOD nos cloroplastos (BOWLER *et al.*, 1992). Estudos mostram que plantas transgênicas superexpressando diferentes isoenzimas da SOD são mais tolerantes a estresses. Badawi *et al.* (2004), trabalhando com *Nicotiana tabacum*, obteve linhagens tolerantes aos estresses hídrico e salino através da superexpressão da isoenzima citosólica, a Cu/Zn-SOD. Wang *et al.* (2004), observaram que um mutante de *Arabidopsis* superexpressando a Mn-SOD era tolerante à salinidade.

A CAT elimina o  $H_2O_2$  convertendo-o a  $H_2O$  e  $O_2$  e é encontrada principalmente nos peroxissomos e glioxissomos. Ela atua na remoção do peróxido de hidrogênio gerado durante a fotorrespiração e  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos (XIONG; ZHU, 2002). A CAT exibe alta afinidade por  $H_2O_2$ , podendo atuar sobre este antes que o mesmo se difunda para outras partes da célula (SCANDALIOS, 2002). Diferentemente, Willekens *et al.* (1997), afirmam que a CAT apresenta elevada taxa catalítica, porém, baixa afinidade por seu substrato ( $H_2O_2$ ). Todas as isoformas dessa enzima são tetraméricas e apresentam pesos moleculares superiores a 220.000, sendo muitas as formas de CAT descritas em plantas (McKERSIE; LESHEM, 1994). Porém, Parida *et al.* (2004b), trabalhando com *Bruguiera parviflora* cultivada hidropônicamente em níveis crescentes de salinidade, constataram a presença de quatro isoformas distintas de CAT,

com pesos moleculares variando de 59.800 a 198.800, sendo a intensidade das isoformas e suas atividades diminuídas pela salinidade.

A APX é uma importante enzima do sistema antioxidativo e que atua reduzindo o  $H_2O_2$  à água, usando ascorbato como agente redutor (ASADA, 1992). A expressão da APX é regulada por distintos mecanismos em resposta a estresses ambientais ou a determinadas condições celulares, e essa enzima detém um papel cooperativo de proteger organelas e minimizar a injúria aos tecidos (SHIGEOKA *et al.*, 2002). Diferentes isoformas de APX representam um importante componente que visa prevenir o estresse oxidativo em organismos fotossintetizantes, e, estudos recentes ressaltam que o controle da concentração de  $H_2O_2$  pela APX é importante no processo de sinalização intracelular de plantas expostas a condições de estresse e ao ataque de patógenos (SHIGEOKA *et al.*, 2002).

Para regenerar o ascorbato utilizado pela APX e continuar decompondo o  $H_2O_2$ , as plantas possuem o ciclo do ascorbato-glutationa (Figura 2). Inicialmente, a APX decompõe o  $H_2O_2$  a água, com a concomitante formação de monodesidroascorbato (MDHA), utilizando o ascorbato como doador de elétrons. O MDHA pode ser convertido espontaneamente em ascorbato e desidroascorbato (DHA) ou pode ser diretamente reduzido a ascorbato pela ação da MDHAR, a qual utiliza o NAD(P)H como poder redutor. O ascorbato pode também ser regenerado a partir do DHA pela ação da enzima DHAR, a qual faz uso dos elétrons provenientes da glutathione reduzida (GSH). Por sua vez, a glutathione oxidada (GSSG) formada é regenerada pela enzima redutase da glutathione (GR) utilizando equivalentes redutores do NAD(P)H (SHIGEOKA *et al.*, 2002). Dessa forma, a ação combinada da APX com um efetivo funcionamento do ciclo do ascorbato-glutationa pode prevenir a acumulação de níveis tóxicos de  $H_2O_2$  nos organismos fotossintetizantes (ASADA, 1992).



**Figura 2.** Ciclo do ascorbato-glutationa (adaptado de Mckersie; Leshem, 1994).

A GPX é uma peroxidase não-específica quanto ao substrato doador de elétrons, e decompõe o  $H_2O_2$  pela oxidação de compostos fenólicos como o guaiacol (BRAY *et al.*, 2000; KANG; SALTVEIT, 2001). Ela apresenta-se em diferentes isoformas e quantidades entre as diversas plantas, ou mesmo entre as diferentes partes de uma mesma planta (YE *et al.*, 1990; SREENIVASULU *et al.*, 1999). Essas enzimas estão localizadas no vacúolo, na parede celular e no citosol (ASADA, 1992). Acredita-se que as enzimas do sistema antioxidativo estejam envolvidas com os principais mecanismos de tolerância das plantas a estresses ambientais (BOR *et al.*, 2003). Dessa forma, muitos estudos têm mostrado uma correlação entre a tolerância à salinidade e a presença de um eficiente sistema antioxidativo nos genótipos tolerantes (SAIRAM *et al.*, 2002, em *Triticum aestivum* L.; VAIDYANATHAN *et al.*, 2003 e DEMIRAL; TÜRKAN, 2005, em *Oriza sativa* L.; BOR *et al.*, 2003, em *Beta vulgaris*; AZEVEDO NETO *et al.*, 2006, em *Zea mays*.). Mittova *et al.* (2002), estudando o papel de vários antioxidantes na tolerância à salinidade em tomate, observaram que a maior tolerância da espécie selvagem, *Lycopersicon*

*pennellii*, em comparação com o cultivar *Lycopersicon esculentum*, estava relacionada aos aumentos nas atividades das enzimas SOD, APX e GPX.

## **2.5. Ajustamento osmótico**

Muitas espécies, quando submetidas a estresse hídrico ou salino, mantêm o gradiente de potencial hídrico entre o ambiente radicular e a planta graças à absorção de íons e ao acúmulo de solutos orgânicos de baixa massa molecular. Os íons inorgânicos e ácidos orgânicos tendem a se acumular no vacúolo, enquanto que outros solutos orgânicos ou osmólitos, como aminoácidos, compostos N-aminossolúveis, carboidratos solúveis e compostos de amônio quaternário acumulam-se no citosol. A este fenômeno deu-se o nome de ajustamento osmótico (ASHRAF; HARRIS, 2004; CHINNUSAMY *et al.*, 2005), que, além de manter o gradiente de potencial hídrico no sistema solo-planta, é apontado como responsável pela manutenção da turgescência das células, de forma a permitir o crescimento celular (SMIRNOFF, 1998). Além disso, acredita-se que esses solutos atuem como osmoprotetores ajudando na manutenção da integridade das macromoléculas e eliminação de várias ROS (HONG *et al.*, 2000; XIONG; ZHU, 2002).

## **2.6. Tolerância das plantas à salinidade**

De acordo com a tolerância aos sais, as plantas podem ser agrupadas em dois grandes grupos: as halófitas e as glicófitas (FAGERIA; GHEYI, 1997). Enquanto as halófitas são capazes de crescerem em solos com concentração de sais de até 20%, a maioria das plantas cultivadas (glicófitas), tem seu crescimento inibido em concentrações da ordem de 0,3 a 0,5% (LEVITT, 1980).

De acordo com Parida e Das (2005), a tolerância à salinidade expressa a habilidade das plantas de crescerem e completarem seus ciclos de vida em substratos que contenham elevadas concentrações de sais solúveis. Os mecanismos de tolerância à salinidade em plantas podem ser de dois tipos: aqueles que minimizam a entrada de sal na planta, e aqueles que minimizam a concentração de sais no citoplasma. As halófitas, plantas tolerantes à salinidade, apresentam ambos os mecanismos mencionados. Elas excluem o sal eficientemente, embora, também compartimentalizem no vacúolo o sal absorvido do meio (AMOR *et al.*, 2005).

As glicófitas, diferentemente das halófitas, não possuem características ou alterações morfo-fisiológicas específicas tão eficientes à tolerância aos sais, de maneira que seus processos metabólicos são afetados negativamente com o aumento das concentrações de sais solúveis na solução do solo (GEENWAY; MUNNS, 1980).

As plantas desenvolveram uma grande variedade de mecanismos bioquímicos e moleculares para enfrentar o estresse salino. As estratégias bioquímicas incluem: (i) acumulação seletiva de íons e controle do transporte para as folhas; (ii) compartimentalização de íons em organelas celulares ou regiões da planta; (iii) síntese de solutos compatíveis; (iv) alterações na fotossíntese; (v) modificações na estrutura das membranas; (vi) indução de enzimas antioxidativas, e (vii) indução de hormônios vegetais (PARIDA; DAS, 2005).

## **2.7. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio**

O  $H_2O_2$  é um componente vital para o desenvolvimento, metabolismo e homeostase de diferentes organismos (BIENERT *et al.*, 2006). Nas plantas, é uma das ROS mais estáveis, estando envolvida nos processos de aclimação, defesa e desenvolvimento (ŚLESIAK *et al.*,

2007). Diferentemente do superóxido, o peróxido de hidrogênio não é um radical livre e não apresenta carga (HALLIWELL, 2006). Por isso, e devido à sua longa meia-vida quando comparada às de outras ROS, o mesmo pode atuar como uma molécula sinalizadora capaz de percorrer longas distâncias até o seu alvo (VRANOVÁ *et al.*, 2002). Além disso, canais de membrana transportadores de água, conhecidos como aquaporinas, podem facilitar o movimento de  $H_2O_2$  transmembranar (HENZLER; STEUDEL, 2000). Nos sistemas biológicos, o peróxido de hidrogênio pode ter surgido juntamente com o metabolismo aeróbico. Elevadas concentrações dessa substância são potencialmente tóxicas para uma grande variedade de macromoléculas, entretanto, mecanismos de eliminação parecem ter surgido nos primórdios do processo de evolução (BIENERT *et al.*, 2006).

Até pouco tempo atrás, o peróxido de hidrogênio era visto unicamente como um metabólito tóxico para a célula. Porém, segundo Uchida *et al.* (2002), essa ROS somente é tóxica em altas concentrações. Estudos genéticos e bioquímicos recentes confirmam que o  $H_2O_2$  funciona como uma molécula sinalizadora em plantas sob condições de estresses biótico e abiótico (NEILL *et al.*, 2002), estando envolvida no fechamento estomático, gravitropismo radicular e tolerância à deficiência de oxigênio (NEILL *et al.*, 2002). De acordo com Bienert *et al.* (2006), o  $H_2O_2$  atua nas células como um mensageiro secundário, aumentando o fluxo de íons  $Ca^{2+}$ , e modificando o padrão de proteínas e de expressão gênica. Para Agarwal *et al.* (2005), o  $H_2O_2$  produzido em resposta à aplicação exógena de  $Ca^{2+}$  ou moléculas sinalizadoras (ABA e ácido salicílico) pode induzir a síntese ou ativação de fatores de transcrição que estão associados à indução de várias enzimas antioxidantes. Embora o  $H_2O_2$  seja uma molécula sinalizadora que afeta a transcrição, não está claro se ele atua diretamente como sinalizador ou se a oxidação de outras moléculas pelo mesmo é necessária para gerar o sinal intracelular (DESIKAN *et al.*, 2003).



Uchida *et al.* (2002), demonstraram que plantas de arroz pré-tratadas com  $H_2O_2$  e óxido nítrico (NO) apresentaram uma maior resistência ao estresse salino, sugerindo que tais compostos são possíveis fatores responsáveis pelo aumento da tolerância a estresses abióticos. Azevedo Neto *et al.* (2005), trabalhando com milho, também observaram que o pré-tratamento com baixas concentrações de  $H_2O_2$  na solução nutritiva induziu aclimação das plantas à salinidade. Em plantas de milho, a produção de  $H_2O_2$  também foi aumentada em resposta ao estresse de frio, e sua aplicação exógena aumentou a tolerância do milho ao resfriamento (PRASAD *et al.*, 1994). Gong *et al.* (2001), verificaram que a aplicação exógena de  $H_2O_2$  aumentou a resistência das plântulas de milho ao calor, frio, seca e salinidade; o que sugere que o  $H_2O_2$  pode funcionar como molécula sinalizadora, iniciando o processo de tolerância cruzada. Recentemente, Wahid *et al.* (2007), trabalhando com plantas de trigo provenientes de sementes pré-tratadas com  $H_2O_2$  e submetidas à salinidade, observaram que o pré-tratamento conferiu tolerância à salinidade nas plantas. O acréscimo nos níveis de  $H_2O_2$  em resposta a vários estresses, constitui-se num fator chave que medeia o fenômeno de aclimação e conduz à chamada tolerância cruzada, em que a exposição prévia a um estresse, pode induzir tolerância a uma subsequente exposição de um diferente tipo de estresse (NEILL *et al.*, 2002).

## **2.8. A germinação e as espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Por definição, a germinação compreende os eventos que começam com a absorção de água pela semente quiescente e terminam com a emergência da radícula ou de outra parte do embrião (BEWLEY; BLACK, 1994). Esse processo pode ser dividido em três fases. Durante a fase I, as sementes absorvem água e observam-se incrementos na respiração e na massa das sementes. A fase II é caracterizada por um platô metabólico (BEWLEY, 1997), onde são ativados

os processos metabólicos requeridos para o crescimento do embrião e a conclusão do processo germinativo (CASTRO; HILHORST, 2004). Na fase III, a germinação é completada e ocorre a emergência da radícula ou de outra parte do embrião através das camadas que recobrem a semente (BEWLEY, 1997).

Quando as sementes quiescentes retomam o seu metabolismo através do consumo de oxigênio, da fosforilação oxidativa e da mobilização de reservas, ocorre a formação das ROS (TOMMASI *et al.*, 2001). A produção de ROS durante a germinação pode ser considerada uma causa de estresse que pode afetar o sucesso desse evento. Portanto, os compostos e as enzimas antioxidativas apresentam-se de grande importância para a completa germinação (BAILLY, 2004).

O aumento na concentração de ROS em sementes pode causar estresse oxidativo, entretanto, pode também representar benefícios biológicos, conferindo elevada percentagem de germinação e formação de plântulas vigorosas (SCHOPFER *et al.*, 2001). Espécies reativas de oxigênio, particularmente o  $H_2O_2$ , podem induzir a expressão de muitos genes e podem intervir nas modificações que ocorrem na parede celular, requeridas para alongamento da radícula (GAPPER; DOLAN, 2006). Para Ogawa e Iwabuchi (2001), o  $H_2O_2$  possivelmente promove a germinação de sementes através da oxidação de inibidores de germinação presentes no pericarpo das sementes. Wojtyla *et al.* (2006), sugerem que a produção de ROS e a eliminação no meio pelas sementes constituem uma proteção do embrião contra patógenos. Entretanto, o sistema antioxidativo exerce uma função crucial na regulação da concentração de ROS. Essa regulação pode ser alcançada através de modificações nas concentrações dos antioxidantes de baixo peso molecular, e/ou por diferentes respostas das enzimas do sistema antioxidativo, como alterações nas atividades e expressão de diferentes isoenzimas (WOJTYLA *et al.*, 2006).

## 2.9. A Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura anual, herbácea, cultivada economicamente e, provavelmente, a mais importante planta comercial com origem nas Américas. É uma das culturas mais antigas do mundo, havendo provas arqueológicas e geológicas de que é cultivado há, pelo menos, 5.000 anos (DUARTE, 2000).

O milho pertence à ordem *Gramineae*, família *Graminaceae*, subfamília *Panicoideae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L. Atualmente é considerada a espécie botânica de maior diversidade genética na natureza, apresentando uma enorme quantidade de variedades intra-raciais e genes identificados (SRB, 2001). Os grãos do milho são, geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho. O peso individual do grão varia, em média, de 250 a 300 mg e sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de lipídios (PAES *et al.*, 2006).

O milho é um cereal produzido em quase todos os continentes, sendo sua importância econômica caracterizada pelas diversas formas de utilização, que vão desde o uso na alimentação animal até a indústria de alta tecnologia, como na produção de filmes e embalagens biodegradáveis. Cerca de 70% da produção mundial de milho são destinadas à alimentação animal, podendo esse percentual chegar a 85%, em países desenvolvidos. Em termos gerais, apenas 15% de toda a produção mundial destinam-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES *et al.*, 2006). Apesar de não haver uma participação muito grande no uso de milho em grãos, a alimentação humana com derivados de milho constitui fator importante de uso desse cereal em regiões com baixa renda. Em algumas situações, o milho constitui a ração diária de alimentação, como no Nordeste do Brasil, onde o grão compreende a fonte de energia para muitas

pessoas que vivem no semi-árido. Outro exemplo está na população mexicana, que tem nesse cereal o ingrediente básico para a sua culinária (DUARTE, 2000).

No Brasil, cerca de 4% do total da produção de milho (representando aproximadamente 1,6 milhões de toneladas) têm sido utilizadas diretamente como alimento humano e cerca de 10% pela indústria alimentícia, que transforma os grãos em diversos produtos, tais como amido, farinhas, canjica (mungunzá), flocos de milho, xaropes, entre outros. A população da região Nordeste é a maior consumidora de milho, com um consumo *per capita* anual da ordem de 11 kg, cifra 40% superior à média nacional de aproximadamente 7,7 kg (PAES *et al.*, 2006). De acordo com dados da Associação Brasileira das Indústrias de Milho (ABIMILHO) do ano de 2006, a principal utilização do milho no Brasil foi na alimentação avícola, sendo responsável por 48,21% do consumo total. Em seguida, aparece a suinocultura com 29,43%. Na região Nordeste, os principais avicultores encontram-se nos estados do Ceará e Pernambuco, grandes mercados consumidores de milho da região (CARNEIRO *et al.*, 2006). Além das utilizações anteriormente mencionadas, é importante ressaltar que o milho não possui apenas aplicações alimentícias. O uso dos seus derivados estende-se às indústrias química, farmacêutica, de papéis, têxtil, entre outras de aplicações ainda mais nobres (PAES *et al.*, 2006).

No que diz respeito ao emprego de mão-de-obra, cerca de 14,5% das pessoas ocupadas nas lavouras temporárias e 5,5% dos trabalhadores do setor agrícola estão ligados à produção de milho. No setor agropecuário, a produção de milho só é excedida pela pecuária bovina, em termos de utilização de mão-de-obra, apesar das tecnologias modernas utilizadas na produção desse cereal serem poupadoras de mão-de-obra (DUARTE, 2000).

Do exposto, observa-se que a importância do milho não está apenas na produção de uma cultura anual, mas em todo o relacionamento que essa cultura tem na produção agropecuária

brasileira, tanto no que diz respeito a fatores econômicos quanto a fatores sociais. Pela sua versatilidade de uso, pelos desdobramentos de produção animal e pelo aspecto social, o milho é um dos mais importantes produtos do setor agrícola no Brasil (DUARTE, 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Gerais**

Avaliar os efeitos do peróxido de hidrogênio sobre a germinação e a aclimação das plantas de milho ao estresse salino, estudando os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos.

#### **3.2. Específicos**

1. Estudar os efeitos do peróxido de hidrogênio na germinação das sementes de milho;
2. Estudar os efeitos da embebição de sementes de milho com  $H_2O_2$  sobre a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GPX e isoenzimas de SOD e CAT;
3. Utilizando-se plantas sob condições controle e de estresse salino, provenientes de sementes pré-tratadas ou não com  $H_2O_2$ , pretende-se:
  - Analisar o crescimento das plantas, através de medidas de área foliar e de matéria seca da parte aérea e raízes;
  - Analisar os teores relativos de clorofila e as trocas gasosas (condutância estomática, fotossíntese, taxa de transpiração e concentração interna de  $CO_2$ ).
  - Estudar a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GPX e das isoenzimas de SOD e CAT;
  - Analisar os teores de solutos orgânicos (proteínas solúveis, carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e prolina) e inorgânicos ( $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$ ), em folhas e raízes;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de milho (*Zea mays* L.) do híbrido triplo BRS 3003, utilizadas nos experimentos, foram provenientes do Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará. Os experimentos foram conduzidos em sala de germinação e casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

### 4.1. Experimento I - Efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na percentagem de germinação de sementes de milho

Este experimento teve por finalidade investigar os efeitos do peróxido de hidrogênio na germinação das sementes de milho. Para isso, as sementes de milho, após seleção e esterilização com solução de hipoclorito de sódio a 0,7%, foram lavadas com água destilada, para retirar os resíduos do esterilizante, e então colocadas para germinar em caixas plásticas do tipo gerbox (11,0 cm x 11,0 cm x 3,0 cm) contendo 75 mL de água destilada ou soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 100 e 500 mM, sendo mantidas no escuro. Após 36 h da semeadura e a intervalos de, no máximo duas horas, foram efetuadas contagens de sementes germinadas considerando-se como critério a emergência da radícula. O experimento foi realizado com 5 repetições, sendo cada repetição formada por um grupo de 20 sementes. Os resultados foram expressos em percentagem de germinação.

O experimento foi conduzido em sala de germinação. Os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar durante o período experimental foram, respectivamente,  $24,3 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  e  $71,7 \pm 5,4\%$ .

## **4.2. Experimento II - Efeitos da embebição de sementes de milho com $H_2O_2$ sobre a atividade enzimática e nos padrões eletroforéticos de isoenzimas antioxidativas**

Neste experimento, foram determinadas as atividades das enzimas dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase do guaiacol em sementes de milho embebidas com peróxido de hidrogênio, bem como os padrões eletroforéticos das isoenzimas de catalase e dismutase do superóxido. Para isso, as sementes foram colocadas em caixas plásticas gerbox (11,0 cm x 11,0 cm x 3,0 cm) contendo 75 mL de água destilada ou solução de  $H_2O_2$  a 100 mM por 12, 24, 30, 36, 42 e 48 h, quando então foram coletadas, pesadas e armazenadas a -25°C até posterior utilização. O experimento foi conduzido em condições ambientais semelhantes às descritas no experimento I

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos (água destilada e solução de  $H_2O_2$  a 100 mM) e seis tempos de embebição (12, 24, 30, 36, 42 e 48 h). O experimento foi realizado com quatro repetições, sendo cada uma constituída por dez sementes.

### **4.2.1. Preparação do extrato de sementes**

O extrato base para a determinação das atividades enzimáticas e dos padrões eletroforéticos das isoenzimas (zimogramas) foi obtido a partir da maceração, em almofariz, de 10 sementes de milho com 10,0 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a 12.000 x g durante 15 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4°C e o sobrenadante (extrato) foi armazenado a -25°C até o momento das análises.



#### **4.2.2. Atividade enzimática em sementes de milho**

##### **4.2.2.1. Dismutase do superóxido**

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi determinada de acordo com o método de Beauchamp e Fridovich (1971). Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato diluído foi adicionada a 1.450  $\mu\text{L}$  da mistura de reação formada por metionina a 13 mM, azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT) a 75  $\mu\text{M}$ , EDTA a 100 mM e riboflavina a 2  $\mu\text{M}$ , todos em tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8. A reação foi conduzida a 25°C em uma câmara de reação revestida internamente com papel alumínio e iluminada com duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, por 15 min (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A atividade enzimática foi estimada através do aumento da absorbância em 560 nm, devido à produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT. Os resultados foram expressos em UA  $\text{g}^{-1}$  MF, sendo uma UA (unidade de atividade enzimática) definida como sendo a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da fotorredução do NBT, no período de 15 min.

##### **4.2.2.2. Catalase**

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com Havir e McHale (1987). Foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  do extrato a um meio contendo 1.410  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM e 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,5 M. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância em 240 nm, devido ao consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  MF usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4.2.2.3. Peroxidase do ascorbato

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981). Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático a uma mistura de reação constituída de 50  $\mu\text{L}$  de ascorbato a 15 mM e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30 mM, em 1.350  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,0. Determinou-se a atividade da enzima pela oxidação do ascorbato, medida pelo decréscimo na absorbância em 290 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$  usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 2,8  $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o ascorbato e a estequiometria da reação (dois moles de ascorbato para um mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

#### 4.2.2.4. Peroxidase do guaiacol

A atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de extrato diluído a uma mistura de reação contendo 950  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, 500  $\mu\text{L}$  de guaiacol a 0,02 M e 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 60 mM. A reação foi acompanhada pelo incremento da absorbância em 420 nm, devido à formação do tetraguaiacol. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ , usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ( $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e a estequiometria da reação (cada mol de tetraguaiacol envolve o consumo de quatro moles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Todos os extratos enzimáticos foram dosados em duplicatas e os resultados analisados pelas médias  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.2.3. Padrões eletroforéticos das isoenzimas de CAT e SOD em sementes de milho

Os padrões eletroforéticos das isoenzimas de CAT e SOD foram determinados fazendo-se uso de um sistema nativo em gel de poliacrilamida. Com base nas análises realizadas espectrofotometricamente, as amostras (extratos) mais representativas de cada tratamento foram selecionadas e empregadas para obtenção dos zimogramas. Foram analisados somente os extratos referentes aos tempos de 12, 36 e 48 h de embebição em água destilada ou em solução de  $H_2O_2$  a 100 mM.

A eletroforese em condições nativas foi realizada de acordo com Davis (1964), com pequenas modificações, utilizando-se uma cuba vertical, modelo miniVE (Amersham Biosciences, Sweden), em um sistema descontínuo, constituído por um gel de espaçamento a 5% (Tris-HCl a 0,137 M, pH 6,8) e um gel de separação (Tris-HCl a 0,375 M, pH 8,8) a 7% (para CAT) ou 10% (para SOD). A corrida eletroforética foi desenvolvida por aproximadamente 2 h, a 300 V e 4 °C, usando-se um tampão de corrida contendo Tris-HCl a 25 mM, pH 8,3 e glicina a 250 mM.

A revelação da atividade da CAT no gel foi feita seguindo-se a metodologia desenvolvida por Woodbury *et al.* (1971). Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em solução de  $H_2O_2$  a 0,01%, por 15 min. Em seguida, foi lavado com água destilada por aproximadamente 2 min. Finalmente, o gel foi colocado em solução de revelação ( $FeCl_3$  a 1% e  $K_3[Fe(CN)_6]$  a 1%) por 3 min, sendo observadas bandas acromáticas de atividade catalásica em um fundo verde. Foram aplicados, aproximadamente, 40 e 400  $\mu$ g de proteína em cada poço do gel.

A atividade da SOD no gel foi detectada através dos procedimentos descritos por Beauchamp e Fridovic (1971). O gel foi equilibrado com tampão fosfato de potássio a 50 mM

(pH 7,8), contendo riboflavina a 0,056 mM e TEMED a 56 mM, por 30 min. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada por 1 min e imediatamente imerso na mesma solução mencionada acima, acrescida de NBT em uma concentração de 3,0 mM, em presença de luz. A atividade foi observada pela presença de bandas acromáticas em um fundo de coloração púrpura. Foram aplicados, aproximadamente, 500 µg de proteína em cada poço do gel.

Para cada extrato foram feitas pelo menos duas eletroforeses com padrões semelhantes. Ao final, os géis foram fotografados com uma câmera digital modelo Olympus X 760.

#### **4.3. Experimento III - Efeito do pré-tratamento de sementes de milho com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a aclimação e a fisiologia e bioquímica das plantas sob condições de estresse salino**

Nesse experimento, testou-se o efeito do pré-tratamento das sementes com peróxido de hidrogênio sobre o crescimento das plantas de milho submetidas à salinidade, bem como seus efeitos em alguns parâmetros fisiológicos e bioquímicos que serão posteriormente descritos.

Os experimentos foram conduzidos em sala de germinação e casa de vegetação, pertencentes ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, no mês de julho de 2007. Durante o período experimental, os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar, registrados com um termohigrógrafo, foram de  $28,5 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$  e  $63,9 \pm 3,5\%$  no interior da casa de vegetação, e de  $24,3 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  e  $71,7 \pm 5,4\%$  na sala de germinação, respectivamente. A radiação fotossinteticamente ativa na sala de germinação e na casa de vegetação foram de 42,6 e 1560  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (medida às 11:00h), respectivamente.

As sementes de milho foram pré-tratadas por 36 horas de embebição em água destilada ou em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM, conforme metodologia descrita no item 4.2. As sementes pré-

tratadas foram postas para germinar em folhas de papel de filtro (30 x 30 cm), esterilizadas por autoclavagem a 121°C, durante 20 min, e umedecidas com solução nutritiva de Hoagland autoclavada (HOAGLAND; ARNON, 1950), diluída 1:2, em presença ou ausência de NaCl a 80 mM. As sementes, em número de 10, foram colocadas em uma única fileira a aproximadamente 1,5 cm da borda superior do papel e a 3,0 cm das bordas laterais. Após a semeadura, as folhas de papel de filtro foram individualmente dobradas ao meio, enroladas e dispostas verticalmente dentro de recipientes plásticos (8 x 8 x 13 cm), contendo 50 ml de solução nutritiva, num total de cinco rolos por recipiente. Em seguida, os recipientes contendo os rolos de papel com as sementes foram acondicionados em cubas de acrílico transparentes (24 x 24 x 50 cm), e deixadas sob fotoperíodo artificial de 12 h, estabelecido por quatro lâmpadas fluorescentes (duas brancas e duas Grolux) de 40 W, cada. Após a montagem dos rolos, distinguiram-se quatro grupos, os quais compreendiam: **1.** sementes pré-tratadas em água destilada e umedecidas com solução nutritiva em ausência de NaCl; **2.** sementes pré-tratadas em água destilada e umedecidas com solução nutritiva em presença de NaCl a 80 mM; **3.** sementes pré-tratadas em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM e umedecidas com solução nutritiva em ausência de NaCl; **4.** sementes pré-tratadas em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM e umedecidas com solução nutritiva em presença de NaCl a 80 mM.

Decorridos seis dias na sala de germinação, as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação e cultivadas em bandejas de plástico contendo 10 L de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950), diluída 1:2, sob aeração constante, em presença ou ausência de NaCl a 80 mM, perfazendo onze plântulas por bandeja nos dias iniciais. Diariamente, os níveis da solução nutritiva foram restituídos pela adição de água destilada e o pH monitorado, sendo mantido próximo a 5,5. A solução nutritiva foi trocada semanalmente. Deste modo, havia quatro grupos diferentes de plântulas: **1.** aquelas provenientes de sementes pré-tratadas com água

destilada e crescendo em ausência de salinidade (controle/água); **2.** aquelas provenientes de sementes pré-tratadas com água destilada e crescendo sob condições salinas (salino/água); **3.** aquelas provenientes de sementes pré-tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM e crescendo em ausência de salinidade (controle/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ); e por fim, **4.** aquelas provenientes de sementes pré-tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM e crescendo sob condições salinas (salino/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0 ou 100 mM), dois níveis de salinidade (0 ou 80 mM de NaCl) e três tempos de coleta (plântulas com 6, 11 e 16 dias de idade). O experimento foi realizado com cinco repetições, sendo cada uma constituída por treze plantas na primeira coleta, seis na segunda e três na terceira.

#### **4.3.1. Coleta do material e medidas de crescimento**

Foram realizadas três coletas, sendo a primeira por ocasião da transferência das plântulas para a casa de vegetação (aos seis dias de idade na sala de germinação), e as outras duas aos onze e dezesseis dias de idade, ou seja, com cinco e dez dias sob condições de casa de vegetação. Durante as coletas, as plântulas foram separadas em raízes, colmos e folhas, quando, então, determinou-se a área foliar (AF) (LI-3100 Area Meter, Li-Cor., Inc, Lincoln, Nebraska, USA). A fim de realizar as análises bioquímicas, as folhas e as raízes foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas, enquanto que os colmos foram deixados em estufa com circulação forçada de ar, a 60 °C, por 48 h. Após a secagem do material coletado, determinou-se a matéria seca (MS) das diferentes partes da planta.

#### **4.3.2. Trocas gasosas e teores relativos de clorofila**

Nos dias em que foram realizadas as coletas, entre 8 e 11 h do dia, foram medidas a taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a taxa de transpiração ( $E$ ) e a

concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ). Utilizou-se um analisador portátil de gás no infravermelho (IRGA, mod. LCI, ADC, Hoddesdon, UK), portando uma fonte de luz com intensidade de  $1.500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (ADC, Hoddesdon, UK). Os teores relativos de clorofila total foram estimados com um medidor de clorofila portátil (Minolta SPAD-502, Osaka, Japão). As medições, tanto das trocas gasosas quanto dos teores relativos de clorofila, foram efetuadas na primeira folha completamente expandida, a contar do ápice, e em condições de temperatura e umidade do ar ambientais.

#### **4.3.3. Preparação dos extratos de folhas e raízes**

O extrato base para determinação das atividades enzimáticas, padrões eletroforéticos das isoenzimas (zimogramas), solutos orgânicos e proteínas solúveis foi obtido a partir da maceração, em almofariz, de 200 mg do tecido liofilizado de folhas ou 150 mg de raízes com 4,0 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM e ascorbato em uma concentração de 2 mM. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a  $12.000 \times g$  durante 15 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante (extrato) foi armazenado a  $-25^\circ\text{C}$  até o momento das análises.

#### **4.3.4. Atividades enzimáticas em folhas e raízes**

As atividades da SOD, CAT, APX e GPX foram determinadas como descrito no item 4.2.2, sendo os resultados expressos em  $\text{UA g}^{-1} \text{MS}$ , para SOD, e em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ , para CAT, APX e GPX.

#### **4.3.5. Padrões eletroforéticos das isoenzimas de CAT e SOD em folhas e raízes de plantas de milho**

Os padrões eletroforéticos das isoenzimas de CAT e SOD de folhas e raízes foram determinados como descrito no item 4.2.3, excetuando-se as concentrações de proteína aplicadas em cada poço do gel. Para obtenção desses padrões para a CAT, em folhas e raízes, foram aplicados aproximadamente 300 µg de proteína em cada poço do gel, enquanto que para os de SOD esses valores foram 500 e 150 µg em cada poço do gel, respectivamente, para folhas e raízes.

#### **4.3.6. Determinação de proteínas solúveis e solutos orgânicos em folhas e raízes**

##### **4.3.6.1. Proteínas solúveis**

Os teores de proteínas solúveis foram determinados de acordo com o método descrito por Bradford (1976). A uma alíquota de 0,1 mL do extrato convenientemente diluído foi adicionado 1,0 mL do reagente de coomassie. Este reagente foi preparado dissolvendo-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Company) em 50 mL de etanol a 95%, acrescidos de 100 mL de ácido fosfórico a 85%. O volume final da solução foi completado para 1000 mL com água destilada. As proteínas solúveis foram estimadas pelas medidas de absorbância em 595 nm, utilizando-se como branco a mistura formada de 0,1 mL do tampão de extração e 1,0 mL do reagente de Coomassie. Como padrão foi utilizada a albumina de soro bovina (Sigma).



#### 4.3.6.2. Carboidratos solúveis

Os teores de carboidratos solúveis foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). A mistura de reação foi constituída por 0,5 mL do extrato convenientemente diluído, 0,5 mL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Utilizou-se como branco a mistura formada por 0,5 mL de água, em substituição ao extrato, acrescida dos demais reagentes empregados na reação. A mistura foi agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 20 min, para o seu resfriamento. Em seguida, procedeu-se à quantificação dos carboidratos solúveis através das medidas de absorbância em 490 nm, utilizando-se como padrão uma curva feita com a D(+) glicose anidra.

#### 4.3.6.3. N-aminossolúveis

Os teores de N-aminossolúveis foram determinados pelo método de Yemm e Cocking (1955), o qual tem como base a reação dos grupos aminos livres com a ninhidrina. Em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, foram adicionados 500 µL do extrato convenientemente diluído, 250 µL do tampão citrato de sódio a 0,2 M, pH 5,0, 500 µL de KCN 0,2 mM em metilcelosolve a 100% e 100 µL de ninhidrina a 5% também em metilcelosolve a 100%. Após agitação em vortex, os tubos fechados foram deixados em banho-maria a 100°C, por 15 min. Interrompeu-se a reação por meio de resfriamento dos tubos em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 650 µL de etanol a 60%. Utilizou-se como branco a mistura formada por 500 µL de água desionizada acrescidos dos demais constituintes da reação. Os N-aminossolúveis foram quantificados por medidas de absorbância em 570 nm, usando-se como padrão uma curva feita com a L-glicina.

#### 4.3.6.4. Prolina

Os teores de prolina foram determinados de acordo com o método de Bates *et al.* (1973), que tem como base a reação com a solução de ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina, em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico a 6,0 M). Em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, foram adicionados 1,0 mL do extrato apropriadamente diluído, 1,0 mL de ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina, em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico a 6 M) e 1,0 mL de ácido acético glacial, sendo a mistura aquecida a 100°C, por 1 h, para o desenvolvimento da cor. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 10 min para interromper a reação. Após o resfriamento, adicionaram-se 2,0 mL de tolueno aos tubos, os quais foram agitados vigorosamente e deixados em repouso. Após repouso e formação de uma mistura bifásica, a fase superior (cromóforo + tolueno) foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur para quantificação de prolina, o que foi feito através de leituras de absorbância em 520 nm, sendo o tolueno usado como branco. Utilizou-se como padrão uma curva feita com L-prolina.

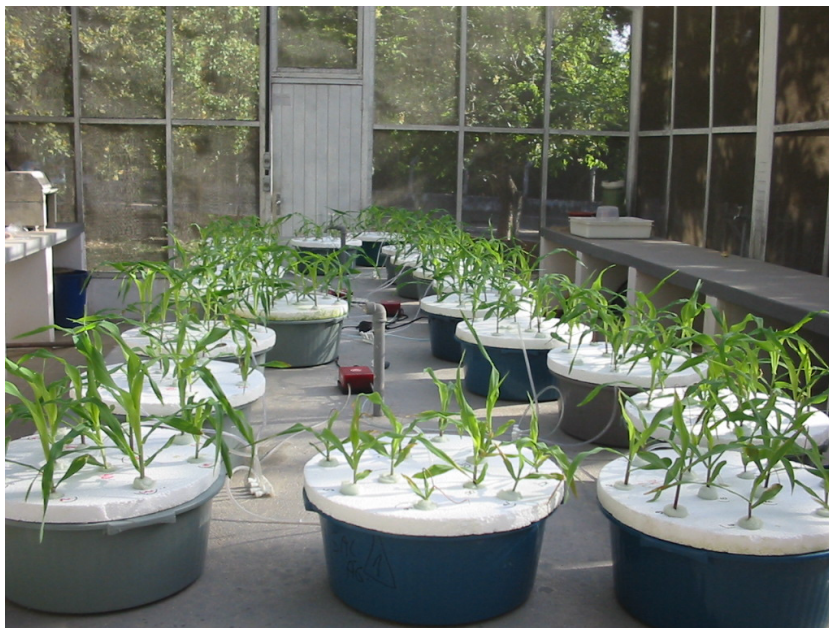
Para a determinação dos solutos orgânicos e proteínas solúveis cada extrato foi dosado em duplicata, sendo os resultados analisados pelos valores da média  $\pm$  desvio padrão. Os teores dos solutos orgânicos foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS, exceto para os de proteína que foram expressos em mg Prot  $\text{g}^{-1}$  MS.

#### 4.3.7. Determinação dos teores de solutos inorgânicos em folhas e raízes

Os teores de sódio, potássio e cloreto foram determinados em tecidos de folhas e raízes. Os extratos foram preparados a partir da homogeneização de 100 mg do material vegetal

liofilizado em 10 mL de água desionizada, durante 60 min, sob agitação constante. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3000 x g por 10 min, sendo o sobrenadante filtrado em papel de filtro e armazenado a -25°C. Os teores de sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama, segundo Malavolta *et al.* (1989). Para a determinação dos teores de cloreto, a 3,0 mL do extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL do reagente formado pela mistura de  $\text{Hg}(\text{SCN})_2$  a 13,2 mM, em metanol, e  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  a 20,2%, em água desionizada, na proporção de 4:1. Após agitação vigorosa, os tubos permaneceram em repouso por 15 min, sendo os teores de cloreto estimados através de leituras de absorbância em 460 nm, utilizando-se NaCl como padrão (GAINES *et al.*, 1984).

Para as determinações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , foi feita uma leitura no fotômetro de chama para cada extrato, enquanto que para as de  $\text{Cl}^-$ , cada extrato foi dosado em duplicata. Os teores de solutos inorgânicos foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS.



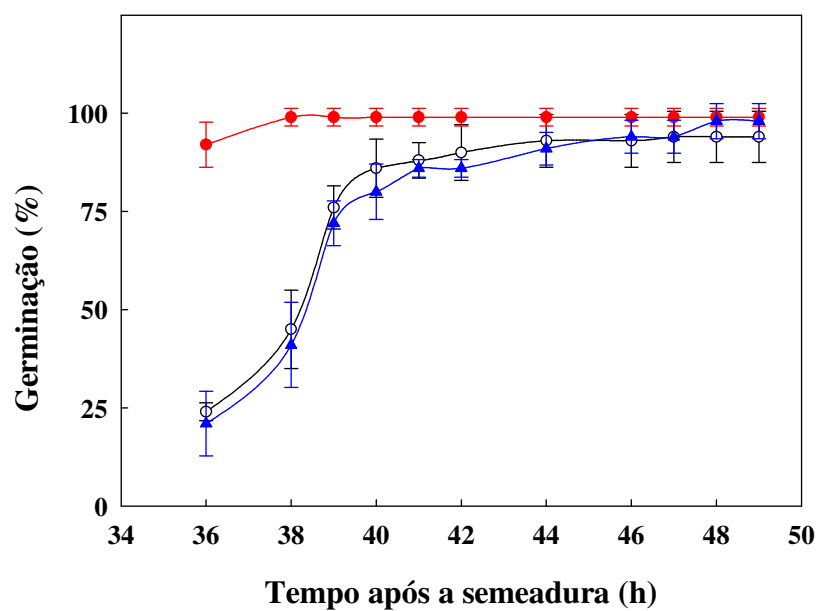
**Figura 3.** Visão geral do experimento em casa de vegetação mostrando plântulas com 11 dias de idade crescendo sob condições hidropônicas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Experimento I - Efeito do $H_2O_2$ na percentagem de germinação de sementes de milho

A Figura 4 mostra as percentagens de germinação de sementes de milho semeadas em água destilada ou em soluções de  $H_2O_2$  nas concentrações de 100 e 500 mM. Não houve diferença significativa na percentagem de germinação entre sementes semeadas em água e aquelas semeadas em presença de  $H_2O_2$  a 500 mM, em nenhum dos tempos de contagens. Ao final de 47 h da semeadura, 96% das sementes em ambos os tratamentos apresentaram-se germinadas. As sementes semeadas em  $H_2O_2$  a 100 mM sofreram uma aceleração no seu processo de germinação, visto que no início da contagem (36 h), 92% destas já apresentavam-se germinadas, enquanto que a média da percentagem de germinação, nesse mesmo tempo, dos outros dois tratamentos foi de apenas 22,5%. Ao final de 38 h da semeadura, cerca de 99% das sementes semeadas em  $H_2O_2$  a 100 mM apresentaram-se germinadas. Portanto, enquanto o  $H_2O_2$  na concentração de 100 mM mostrou-se eficaz em acelerar a germinação das sementes de milho, o mesmo não correu na concentração de 500 mM.

Vários trabalhos relatam o uso do  $H_2O_2$  como uma substância capaz de estimular a germinação. Ching (1959) observou a aceleração do processo germinativo de sementes de *Pseudotsuga menziesii* quando estas germinaram em soluções de  $H_2O_2$  a 1%, em comparação com sementes germinadas em água destilada, sendo a diminuição no tempo de germinação correlacionada ao tempo de embebição. Esse autor verificou que o uso de  $H_2O_2$  na germinação aumentou substancialmente a absorção de água e de  $O_2$  pela semente, indicando uma maior conversão das substâncias de reserva em carboidratos, ocasionando uma maior síntese de componentes celulares. A estimulação da germinação, através do uso de  $H_2O_2$ , também foi



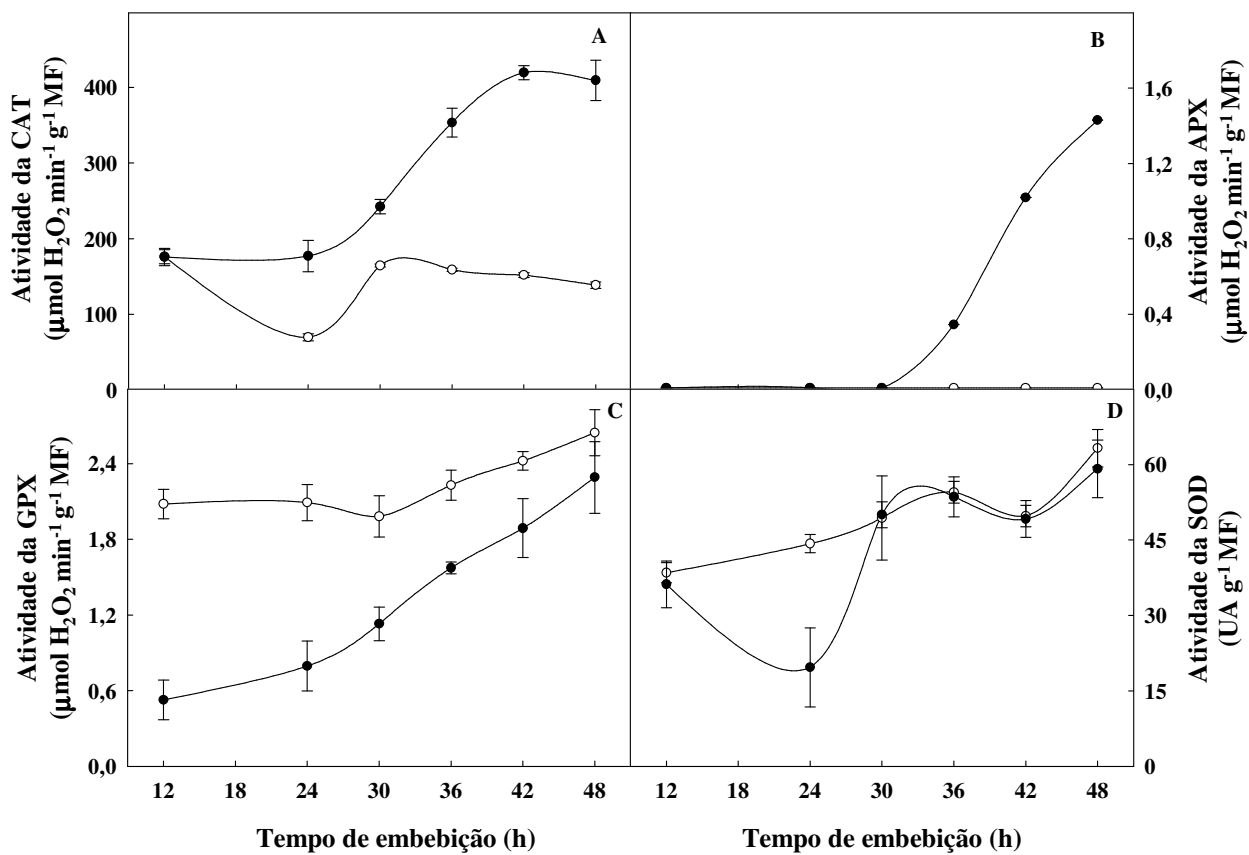
**Figura 4.** Percentagem de germinação de sementes de milho semeadas em água destilada (-○-) e em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (-●-) e 500 mM (-▲-), em função do tempo.

observada em sementes de *Panicum virgatum*, *Andropogon gerardii*, *Sorghastrum nutans* (SARATH *et al.*, 2007) e *Zinnia elegans* (OGAWA; IWABUCHI, 2001). Para Ogawa e Iwabuchi (2001), é possível que o  $H_2O_2$  promova a germinação de sementes através da oxidação de inibidores de germinação presentes no pericarpo das sementes.

## **5.2. Experimento II - Efeito da embebição de sementes de milho com $H_2O_2$ sobre a atividade enzimática e nos padrões eletroforéticos de isoenzimas do sistema antioxidativo**

### **5.2.1. Atividade enzimática**

A Figura 5 apresenta o efeito do peróxido de hidrogênio na atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX) e dismutase do superóxido (SOD) em sementes de milho embebidas por 12, 24, 30, 36, 42 e 48 h em água destilada ou em solução de  $H_2O_2$  a 100 mM. Como pode ser observado, não houve diferença significativa na atividade da CAT (Figura 5A) entre as sementes embebidas em água destilada e aquelas embebidas em  $H_2O_2$  no tempo de 12 h. Porém, com 24 h de embebição, enquanto que nas sementes embebidas com água destilada, observou-se uma redução de 61% na atividade da CAT, nas sementes embebidas com  $H_2O_2$  a atividade não se alterou em relação aquelas embebidas por 12 h. Com 30 h de embebição, constatou-se que as sementes embebidas em água destilada retomaram a atividade apresentada com 12 horas, a qual se manteve praticamente constante em tempos mais longos de embebição testados, enquanto a atividade da CAT em sementes embebidas em  $H_2O_2$  apresentou um aumento a partir deste tempo de embebição (30 h), o qual correspondeu a 48, 122, 176 e 195% da atividade observada nas sementes embebidas em água destilada após 30, 36, 42 e 48 horas, respectivamente.



**Figura 5.** Atividades das enzimas catalase (CAT, A), peroxidase do ascorbato (APX, B), peroxidase do guaiacol (GPX, C) e dismutase do superóxido (SOD, D) em sementes de milho embebidas por 12, 24, 30, 36, 42 e 48 h em água (○) ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM (●).



A atividade da APX (Figura 5B) não foi detectada em sementes embebidas em água destilada. Já nas sementes embebidas em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , essa atividade só foi detectada com 36 h de embebição, e mostrou-se crescente em função do tempo. O máximo de atividade foi alcançado após 48 horas de embebição, sendo observado o valor de  $1,43 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ . Esse valor de atividade da APX foi cerca de 286 vezes menor que aquele observado para a CAT em sementes embebidas com 48 h em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM.

A atividade da GPX mostrou-se maior nas sementes embebidas em água, em relação às embebidas em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ao longo de quase todo o experimento (Figura 5C). A diferença máxima entre a atividade da GPX em sementes embebidas em água destilada e em  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi observada após 12 horas de embebição (295%). Porém, essa diferença foi gradativamente sendo reduzida, em função do aumento na atividade da GPX em sementes com maiores tempos de embebição em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM, de forma que, após 48 h, as atividades dessa enzima, em ambos os tratamentos, não diferiram significativamente entre si. Ao comparar-se a atividade da GPX em cada um dos tratamentos, observou-se um aumento de 27% nas sementes embebidas por 48 horas em água destilada, em relação à atividade observada após 12 horas de embebição, enquanto que naquelas embebidas em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , este incremento foi de 335%. A GPX, da mesma forma que a APX, apresentou valores de atividade muito menores que os da CAT e atingiu o máximo de atividade após 48 h de embebição, em ambos os tratamentos.

Com relação à SOD (Figura 5D), não foram observadas diferenças significativas na atividade entre as sementes embebidas em água destilada ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  em nenhum dos tempos de embebição empregados, à exceção do tempo de 24 horas, quando as sementes embebidas em  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentaram uma redução de 56% na atividade desta enzima, em relação às sementes embebidas em água destilada. Após 48 h, verificou-se um aumento médio de 65% na atividade da

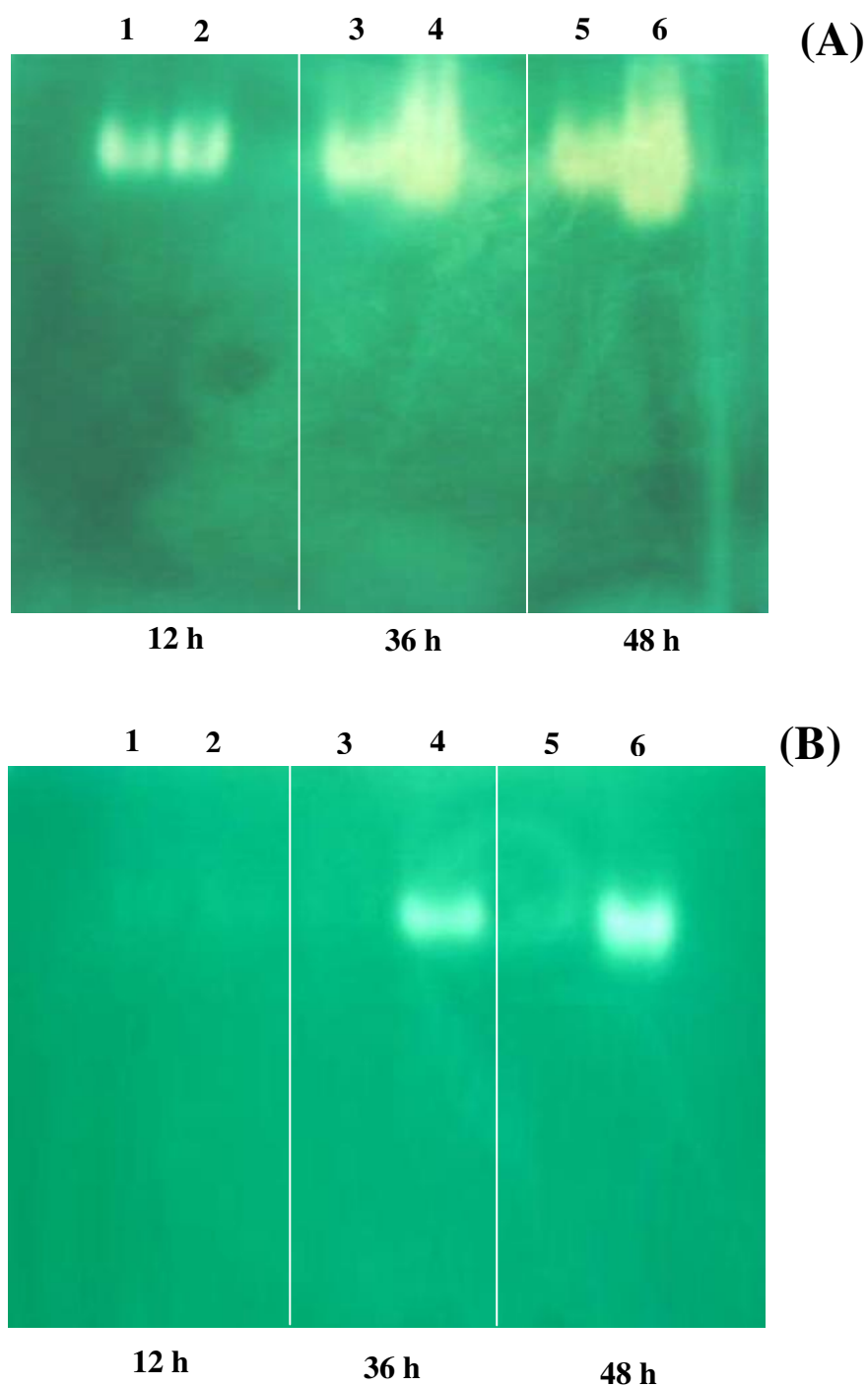
SOD nas sementes de ambos os tratamentos, em relação à atividade observada após 12 horas de embebição. De acordo com McKersie e Leshen (1994), as isoenzimas de SOD diferem quanto à sensibilidade a inibidores como o KCN e o  $H_2O_2$ . Enquanto a isoforma Mn-SOD é resistente a esses dois inibidores, a Cu/Zn-SOD é sensível a ambos. Quanto à Fe-SOD, esta se mostra resistente ao KCN, porém, também sensível ao  $H_2O_2$ . Portanto, é possível que a embebição das sementes com  $H_2O_2$  a 100 mM aliada à respectiva atividade da CAT no período de 24 h tenha contribuído para uma diminuição na atividade da SOD no tempo de 24 h. Sugere-se que a embebição das sementes em peróxido de hidrogênio tenha inibido a atividade ou a síntese *de novo* das isoformas Cu/Zn-SOD e Fe-SOD, que são sensíveis à esta ROS.

Estudos recentes têm tentado elucidar o papel do sistema antioxidativo no processo de germinação. Mylona *et al.* (2007) observaram um aumento na atividade das enzimas CAT e SOD em sementes de milho germinadas na presença de substâncias xenobióticas capazes de gerar ROS. Estes autores sugerem que o aumento da concentração de ROS foi responsável pela indução da atividade dessas enzimas. Liric-Rajlic *et al.* (2003) observaram elevadas atividades da SOD e CAT em sementes de *Chenopodium rubrum* antes da emergência da radícula, enquanto que a atividade da GPX mostrou-se superior apenas após a germinação. Cakmak *et al.* (1993) verificaram incrementos nas atividades das enzimas CAT, APX, GPX, SOD, MDAR e GR durante a germinação de sementes de trigo, denotando o envolvimento dessas enzimas no processo germinativo dessa espécie.

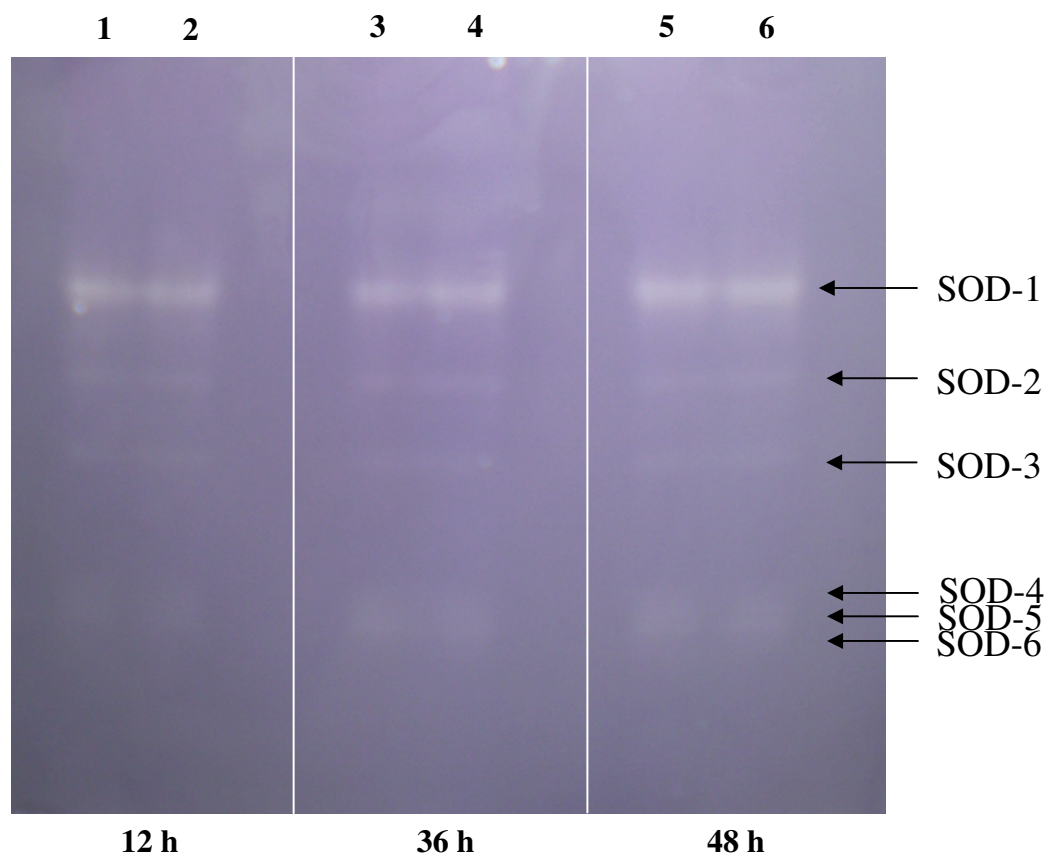
### 5.2.2. Padrões eletroforéticos de isoenzimas de CAT e de SOD em sementes

A Figura 6 apresenta o efeito da embebição de sementes de milho com água destilada e solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM, por 12, 36 ou 48 h, na atividade da CAT em gel de poliacrilamida sob condições nativas. Apenas uma isoforma da CAT foi detectada, sendo esta visível em todos os tratamentos ao aplicar-se aproximadamente 400  $\mu\text{g}$  de proteína (Figura 6A) em cada poço do gel. Entretanto, essa isoforma mostrou-se bem mais intensa nas sementes embebidas em  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 36 e 48 h do que naquelas embebidas em água. Na Figura 6B, em que foram aplicados apenas 40  $\mu\text{g}$  de proteína, mostrou-se claramente uma maior atividade dessa enzima nas sementes que foram embebidas em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Observou-se que, mesmo em menores concentrações de proteína (40  $\mu\text{g}$ ), as sementes embebidas em  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentaram atividade, diferentemente das embebidas em água, cuja atividade não foi detectada. Os resultados encontrados para a atividade de CAT em gel de poliacrilamida estão de acordo com os resultados obtidos espectrofotometricamente (Figura 5A).

Wojtyla *et al.* (2006), estudando separadamente, embriões e cotilédones de sementes de ervilha embebidas em papel de filtro umedecido com água, também constataram a presença de apenas uma isoforma de CAT, sendo a intensidade da banda aumentada com o tempo de embebição. Diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, Mylona *et al.* (2007), estudando cotilédones de sementes de milho colocadas para germinar em meio nutritivo contendo concentrações crescentes de substâncias xenobióticas capazes de gerar ROS, constataram a presença de duas isoformas de CAT, as quais eram intensificadas pelo aumento da concentração empregada. Foram encontradas seis isoformas de SOD em sementes de milho embebidas em água ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM (Figura 7). A isoforma SOD-1, a de menor mobilidade eletroforética,



**Figura 6.** Atividade da catalase em gel de poliacrilamida em sementes de milho embebidas por 12, 36 e 48 h em água destilada (poços 1, 3 e 5) ou em  $H_2O_2$  a 100 mM. (poços 2, 4 e 6). Em (A) foram aplicados aproximadamente 400  $\mu g$  de proteína em cada poço e em (B) 40  $\mu g$ .



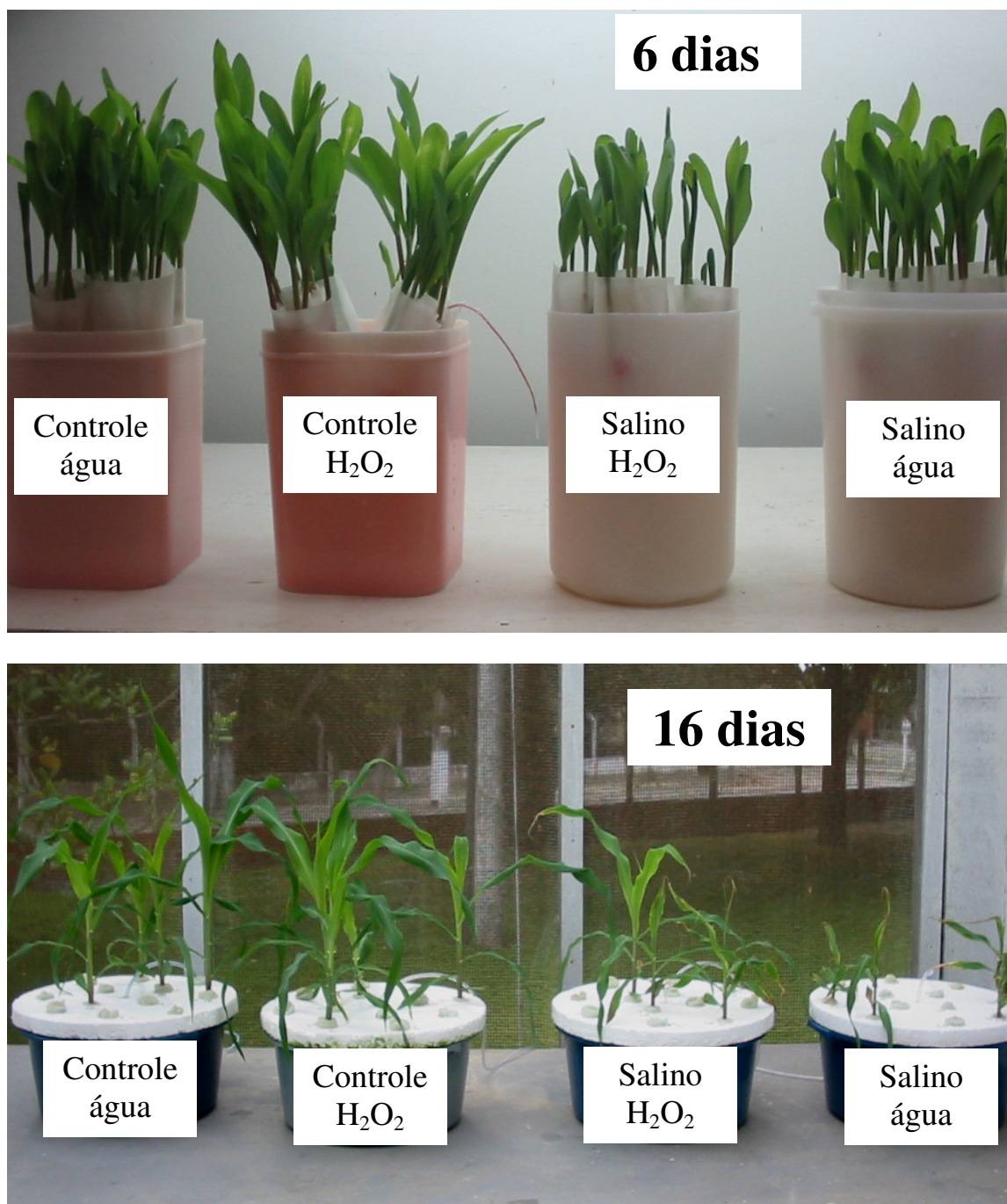
**Figura 7.** Atividade da dismutase do superóxido em gel de poliacrilamida em sementes de milho embebidas por 12, 36 e 48 h em água destilada (poços 1, 3 e 5) ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM. (poços 2, 4 e 6).

mostrou-se mais intensa do que as demais. Na metodologia utilizada, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos empregados. Wojtyla *et al.* (2006), detectaram cinco isoformas de SOD nos embriões (uma Mn-SOD, duas Fe-SOD e duas Cu/Zn-SOD) e quatro nos cotilédones, sendo as mesmas encontradas no embrião exceto com relação a uma das Fe-SOD que não foi detectada. As maiores intensidades das isoformas foram encontradas em embriões com 48 h de embebição.

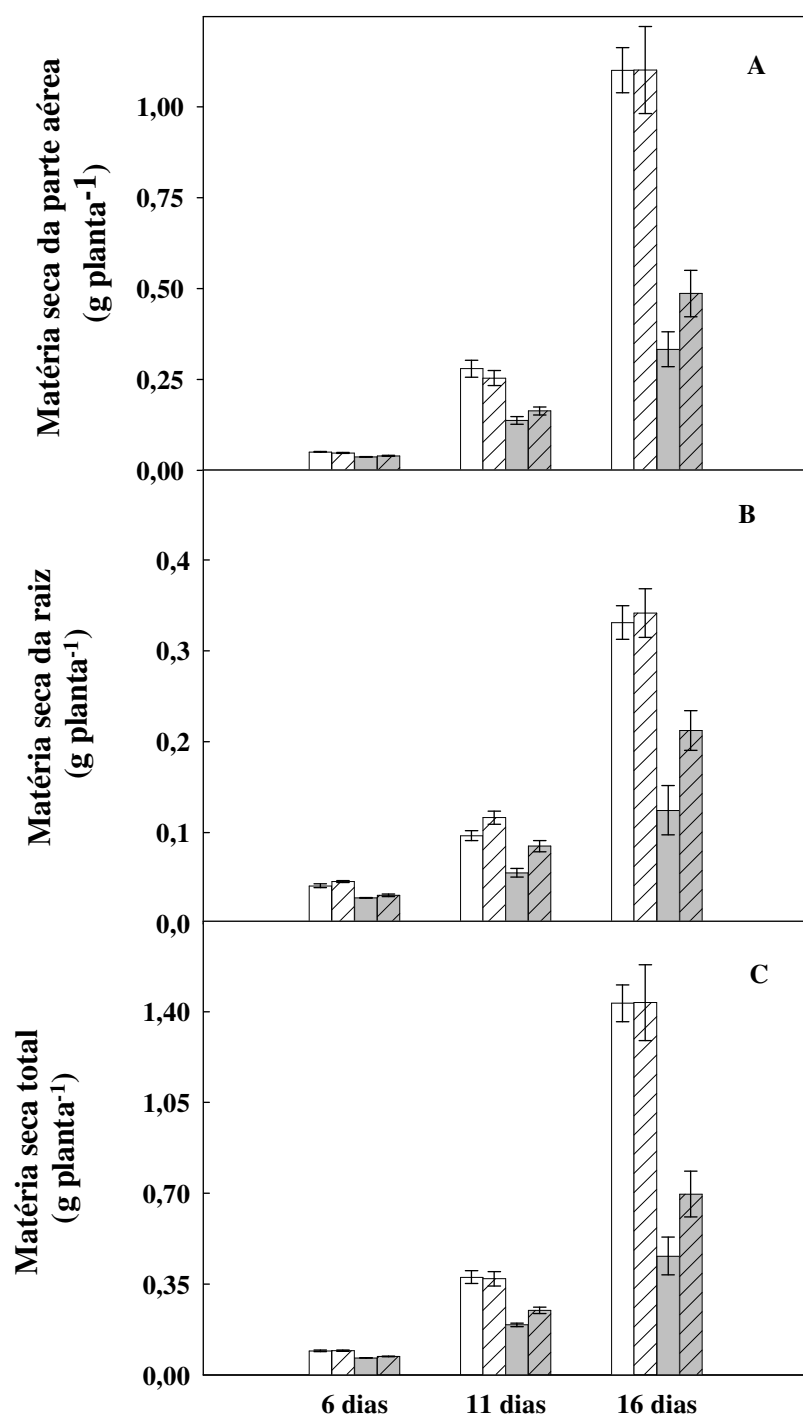
### **5.3. Experimento III - Efeito do pré-tratamento de sementes de milho com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a aclimação e a fisiologia e bioquímica das plantas sob condições de estresse salino**

#### **5.3.1. Crescimento das plantas**

Verificou-se que a salinidade reduziu o crescimento das plantas de milho em comparação àquelas crescendo sob condições controle e que o pré-tratamento das sementes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi eficaz em minimizar esses danos (Figura 8). Os efeitos da salinidade nas matérias secas da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST) de plantas de milho aos 6, 11 e 16 dias de idade, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água destilada ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM são mostrados na Figura 9. Constatou-se que a salinidade reduziu a matéria seca das plantas de milho em todos os tempos de coleta estudados, em comparação àquelas crescendo sob condições controle. Com relação à MSPA (Figura 9A), foram observadas reduções médias de 23 e 43% nesse parâmetro em plântulas aos 6 e 11 dias de idade, respectivamente, em função da salinidade, não havendo diferença significativa entre plantas oriundas de sementes embebidas em água destilada ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aos 6 e 11 dias, visualizou-se apenas uma ligeira tendência de aumento na MSPA das plantas submetidas à salinidade e pré-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em



**Figura 8.** Plantas de milho crescendo sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (Controle/água) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (Controle/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (Salino/água) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (Salino/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), aos 6 e 16 dias de idade.



**Figura 9.** Matérias secas da parte aérea (A), das raízes (B) e total (C) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.



relação àquelas sob estresse salino e oriundas de sementes embebidas em água destilada (tratamento salino/água). Porém, aos 16 dias, constatou-se que as plantas do tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiveram um aumento de 48% no crescimento, em relação às plantas do tratamento salino/água.

Embora a salinidade tenha reduzido a MSR (Figura 9B) das plantas de milho, verifica-se que estes danos foram menos pronunciados no tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cujas plantas apresentaram acréscimos neste parâmetro, em relação ao tratamento salino/água, de 11, 52 e 70%, aos 6, 11 e 16 dias, respectivamente. Não houve diferença significativa entre a MSR das plântulas dos dois tratamentos controle, excetuando-se aos 6 dias de idade, em que as plantas do tratamento controle/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram valores 21% superiores àqueles das plantas do tratamento controle/água.

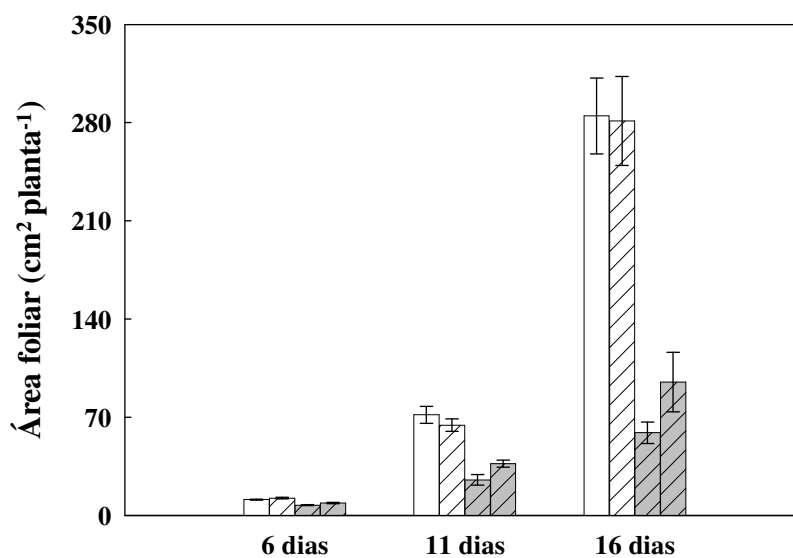
Com relação à MST (Figura 9C), não foram observadas diferenças significativas nesse parâmetro em plântulas crescendo sob condições controle provenientes de sementes pré-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou água e em uma mesma idade (6, 11 ou 16 dias). Entretanto, sob condições salinas, constatou-se que o pré-tratamento das sementes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi eficaz na reversão parcial dos efeitos deletérios da salinidade no crescimento das plantas, sendo observados incrementos de 9, 29 e 53%, para MST, em plântulas aos 6, 11 e 16 dias de idade, respectivamente, em relação às plantas do tratamento salino/água.

Reduções no crescimento das plantas em decorrência da salinidade têm sido verificadas por outros autores, assim como a diminuição de seus efeitos deletérios devido ao pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Costa *et al.* (2003), trabalhando com plantas de feijão-de-corda crescendo em solução nutritiva contendo NaCl a 75 mM, constataram reduções na área foliar e na matéria seca das raízes e partes aéreas dos diferentes cultivares estudados. Uchida *et al.* (2002), trabalhando com

plantas de arroz cultivadas em solução nutritiva contendo NaCl a 100 mM, constataram que o pré-tratamento das plantas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em solução nutritiva, nas concentrações de 1, 10 e 100 µM, reverteu parcialmente a redução no crescimento causada pela salinidade. De forma idêntica, Azevedo Neto *et al.* (2005), trabalhando com plantas de milho, também observaram que o pré-tratamento com baixa concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µM) na solução nutritiva induziu tolerância à salinidade. Recentemente, Wahid *et al.* (2007), trabalhando com plantas de trigo provenientes de sementes pré-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e submetidas à salinidade, observaram que o pré-tratamento conferiu tolerância à salinidade nas plantas.

Da mesma forma que para as medidas de MSPA (Figura 9A), também não foram observadas diferenças significativas na área foliar (AF) das plântulas sob condições controle oriundas de sementes pré-tratadas com água destilada ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e em uma mesma idade (Figura 10). Porém, sob condições salinas, verificou-se que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi eficaz na reversão parcial dos efeitos deletérios da salinidade, sendo observados incrementos de 21, 46 e 62% na AF, em plântulas aos 6, 11 e 16 dias de idade, respectivamente, em relação às plantas do tratamento salino/água. Tais aumentos foram concordantes com os de MSPA (Figura 9A) com relação ao pré-tratamento de embebição das sementes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Azevedo Neto *et al.* (2005), também observaram diminuição dos efeitos deletérios da salinidade na área foliar das plantas milho em função do pré-tratamento das plantas com 1 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio de cultivo hidropônico das plantas.

Reduções na AF em plantas submetidas à salinidade com NaCl têm sido observadas por vários autores (COSTA *et al.*, 2003, em feijão-de-corda; LACERDA *et al.*, 2003, em sorgo; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005, em milho). Altos níveis de sais em folhas maduras de muitas variedades sensíveis ao estresse salino conduzem a efeitos tóxicos que aceleram a senescência



**Figura 10.** Área foliar de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩) aos 6, 11 e 16 dias de idade.

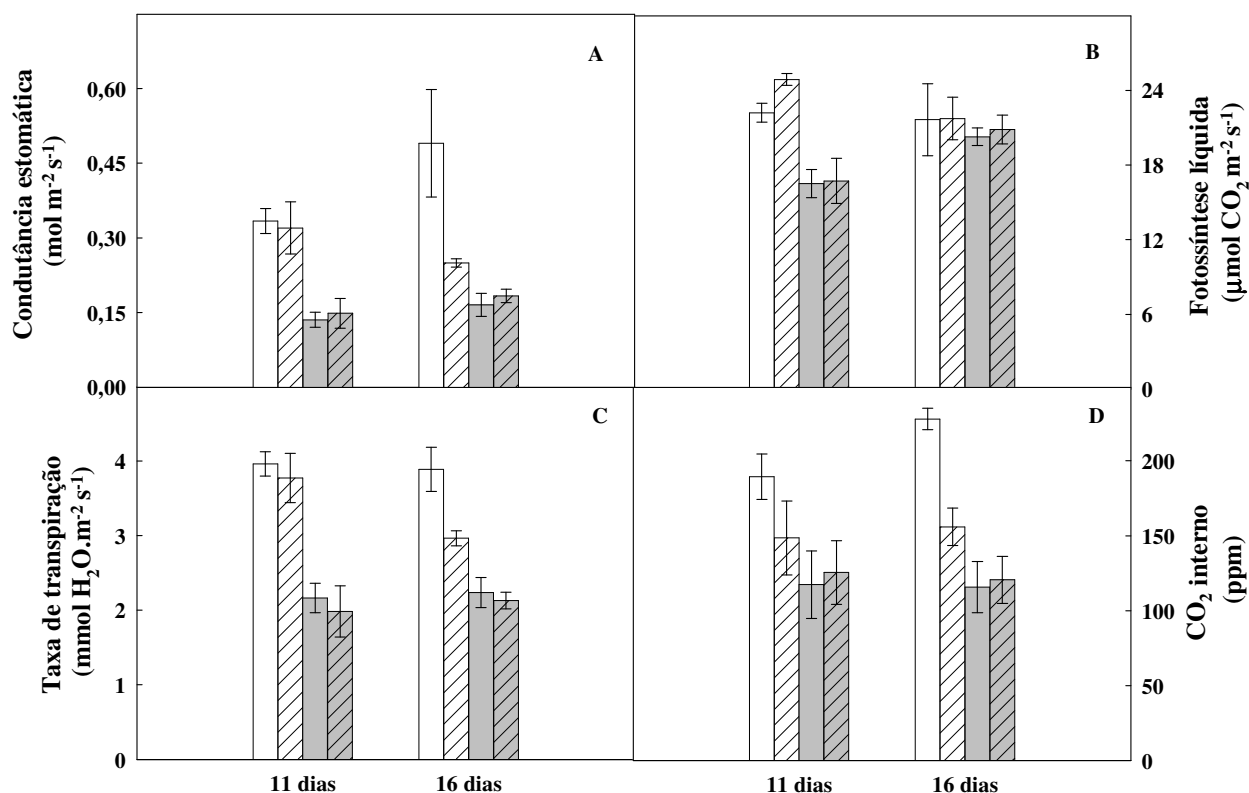
e/ou necrose, reduzindo a área foliar disponível para a fotossíntese, bem como os níveis de hormônios essenciais para o crescimento (NEUMANN, 1997).

### **5.3.2. Trocas gasosas e medidas de clorofila**

Não foi possível, com o equipamento utilizado (o IRGA), determinar as trocas gasosas em plântulas aos 6 dias de idade, em função do pequeno tamanho das mesmas. A condutância estomática ( $g_s$ ) das plântulas com 11 dias de idade foi alterada apenas em função da salinidade (Figura 11A), sendo observada redução média de 55% neste parâmetro, não havendo diferença entre plantas provenientes de sementes embebidas em água ou em  $H_2O_2$ . Já aos 16 dias, constatou-se uma queda nos valores de  $g_s$ , em virtude do  $H_2O_2$  e da salinidade. Os valores de  $g_s$  para as plântulas do tratamento controle/ $H_2O_2$  apresentaram-se 49% inferiores àqueles das plântulas do tratamento controle/água, porém, foram 43% superiores à média dos tratamentos salinos.

Aos 11 dias de idade, a taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ) das plântulas submetidas à salinidade foi, em média, 30% menor do que aquela observada em plântulas sob condições controle (Figura 11B). Ainda aos 11 dias, constatou-se que as plantas do tratamento controle/ $H_2O_2$  apresentaram valores de fotossíntese líquida 12% superiores àqueles verificados em plântulas do tratamento controle/água, não havendo diferenças marcantes entre os tratamentos salino/água e salino/ $H_2O_2$ . Aos 16 dias, não foram encontradas diferenças significativas nesse parâmetro entre os tratamentos empregados.

A taxa de transpiração ( $E$ ) das plântulas sob condições salinas, aos 11 dias de idade, foi reduzida, em média, 46%, em relação às plantas dos tratamentos controles (Figura 11C), não



**Figura 11.** Condutância estomática (A), fotossíntese líquida (B), taxa de transpiração (C) e concentração interna de CO<sub>2</sub> (D) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩) aos 6, 11 e 16 dias de idade.

havendo interferência do  $H_2O_2$  neste parâmetro. Aos 16 dias, a taxa de transpiração das plântulas do tratamento controle/água foi 30% superior àquela das plântulas do tratamento controle/ $H_2O_2$ , provavelmente, em razão da redução na  $g_s$  sofrida por essas plântulas (Figura 11A). Além disso, os valores de  $g_s$  das plântulas deste último tratamento foram 37% superiores à média dos tratamentos salinos/água e salino/ $H_2O_2$ .

Aos 11 e 16 dias de idade, a concentração interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ) apresentou-se mais elevada nas plantas do tratamento controle/água (Figura 11D). Os menores valores foram encontrados nos tratamentos salino/água e salino/ $H_2O_2$ , os quais não diferiram entre si, sendo, em média, 36 e 49% inferiores àqueles encontrados no tratamento controle/água, aos 11 e 16 dias, respectivamente. Nas plântulas, aos 16 dias, verificou-se uma forte ligação entre  $g_s$  e  $C_i$ . O fechamento estomático observado nas plântulas do tratamento controle/ $H_2O_2$ , pode, possivelmente, ter influenciado a concentração interna de  $CO_2$  nestas plantas. Os valores de  $C_i$  observados nas plântulas do tratamento controle/ $H_2O_2$  mostraram-se 32% inferiores àqueles das plântulas do tratamento controle/água.

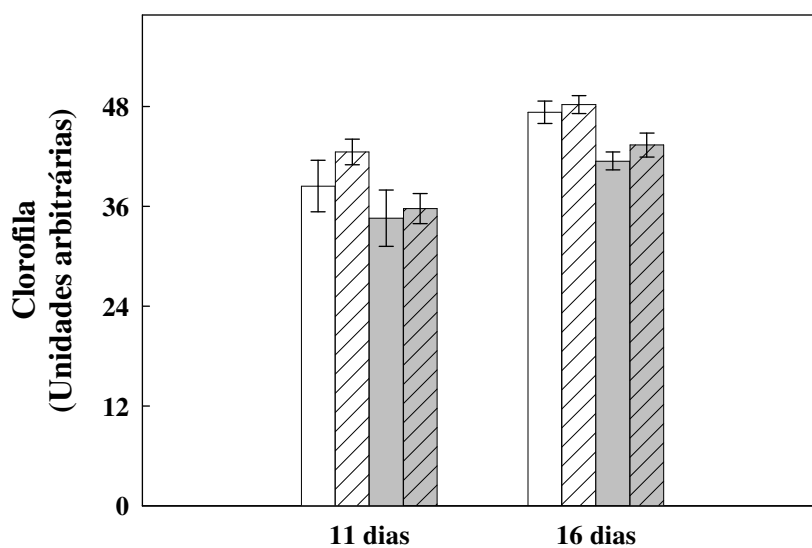
Agastian *et al.* (2000), trabalhando com plantas de amora crescendo sob condições salinas, verificaram que os valores de  $A$ ,  $g_s$  e  $E$  foram reduzidos, enquanto os valores de  $C_i$  foram aumentados nessas circunstâncias. Parida *et al.* (2004a), observaram um aumento nos valores de  $A$  em plantas de *Bruguiera parviflora* submetidas a baixos níveis de salinidade, mas à medida que estes níveis foram aumentados, observou-se um decréscimo nesse parâmetro. Esses autores também observaram que os valores de  $g_s$  sofreram uma diminuição apenas quando as plantas foram expostas a elevadas concentrações de NaCl. Meloni *et al.* (2003), estudando plantas de algodão sob condições salinas, encontraram diminuições nos valores de  $A$ , as quais foram atribuídas principalmente ao fechamento estomático. Em milho, Azevedo Neto *et al.* (2004)

observaram diminuições nos valores de  $g_s$  e  $E$  em sete dos oito genótipos de milho estudados sob condições salinas.

No presente experimento, para as trocas gasosas ( $A$ ,  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i$ ), não foram encontradas diferenças significativas entre plantas salinizadas provenientes de sementes embebidas em  $H_2O_2$  ou em água. Contrariamente, Wahid *et al.* (2007), trabalhando com plantas de trigo oriundas de sementes pré-tratadas com  $H_2O_2$  em concentrações crescentes e submetidas à salinidade, observaram que o pré-tratamento de sementes de trigo com  $H_2O_2$ , principalmente na concentração de 80  $\mu M$ , foi capaz elevar os valores de  $A$ ,  $E$  e  $g_s$ , em comparação às plantas provenientes de sementes não pré-tratadas, tendo os valores se aproximado daqueles encontrados de plantas sob condições controle. Para  $C_i$ , não foram encontradas grandes diferenças entre os tratamentos.

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos nos teores relativos de clorofila das plantas com 11 dias, apenas uma tendência de diminuição em decorrência da salinidade (Figura 12). Aos 16 dias, comparando-se as médias dos tratamentos controles com as médias dos salinos, observou-se uma redução de 12% neste parâmetro, não havendo interferência do peróxido de hidrogênio.

Meloni *et al.* (2003), verificaram reduções nos teores de clorofila em plantas de algodão crescendo sob condições salinas somente no cultivar considerado sensível à salinidade. M'rah *et al.* (2006), trabalhando com *Arabidopsis thaliana* e uma halófito, *Thellungiella halophila*, sob condições salinas, constataram reduções nos teores de clorofila somente na primeira espécie vegetal, sendo os teores extremamente mais elevados e estáveis em presença de NaCl em *T. halophilla*. Para Singh e Dubey (1995), a perda de clorofila é considerada um marcador celular de estresse salino.



**Figura 12.** Teores relativos de clorofila de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩) aos 6, 11 e 16 dias de idade.



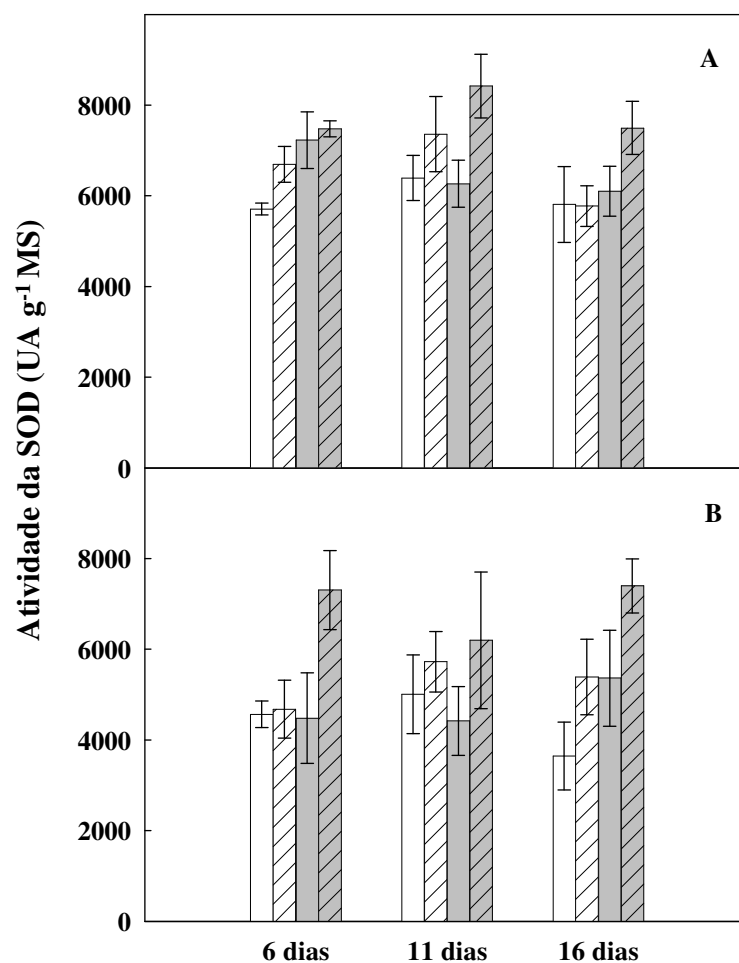
### 5.3.3. Atividades enzimáticas em folhas e raízes

#### 5.3.3.1. Atividade da dismutase do superóxido

A Figura 13 apresenta o efeito da salinidade na atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas e raízes de plantas de milho, aos 6, 11 e 16 dias de idade, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água destilada ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM. Aos 6 dias, verificou-se um aumento de 17% na atividade da SOD nas folhas das plantas do tratamento controle/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , em relação às do tratamento controle/água (Figura 12A). Não foram observadas diferenças significativas entre as plantas submetidas à salinidade, porém a média dos dois tratamentos mostrou-se 29% superior àquela do tratamento controle/água. Aos 11 dias, não houve diferenças significativas entre os tratamentos controle, contudo, observou-se que a atividade da SOD no tratamento salino/ $\text{H}_2\text{O}_2$  foi 34% maior que aquela observada no tratamento salino/água. Aos 16 dias, o tratamento salino/ $\text{H}_2\text{O}_2$  mostrou a maior atividade, sendo 29% superior à média dos tratamentos controles.

Nas raízes, aos 6 dias, não foram encontradas diferenças significativas na atividade da SOD entre os tratamentos, com exceção do tratamento salino/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , o qual apresentou uma atividade 60% superior à média dos outros três tratamentos empregados (Figura 13B). Aos 11 dias, não se visualizou diferenças significativas entre os tratamentos. Aos 16 dias, a atividade da SOD no tratamento controle/ $\text{H}_2\text{O}_2$  mostrou-se 48% superior àquela do controle/água, enquanto no salino/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , houve um aumento de 38%, em relação ao tratamento salino/água.

A SOD representa uma importante defesa das plantas contra as injúrias causadas pelo radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), convertendo-o em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  (VAN BREUSEGEM *et al.*, 2001). Portanto, o aumento em atividade dessa enzima em plantas provenientes de sementes pré-tratadas



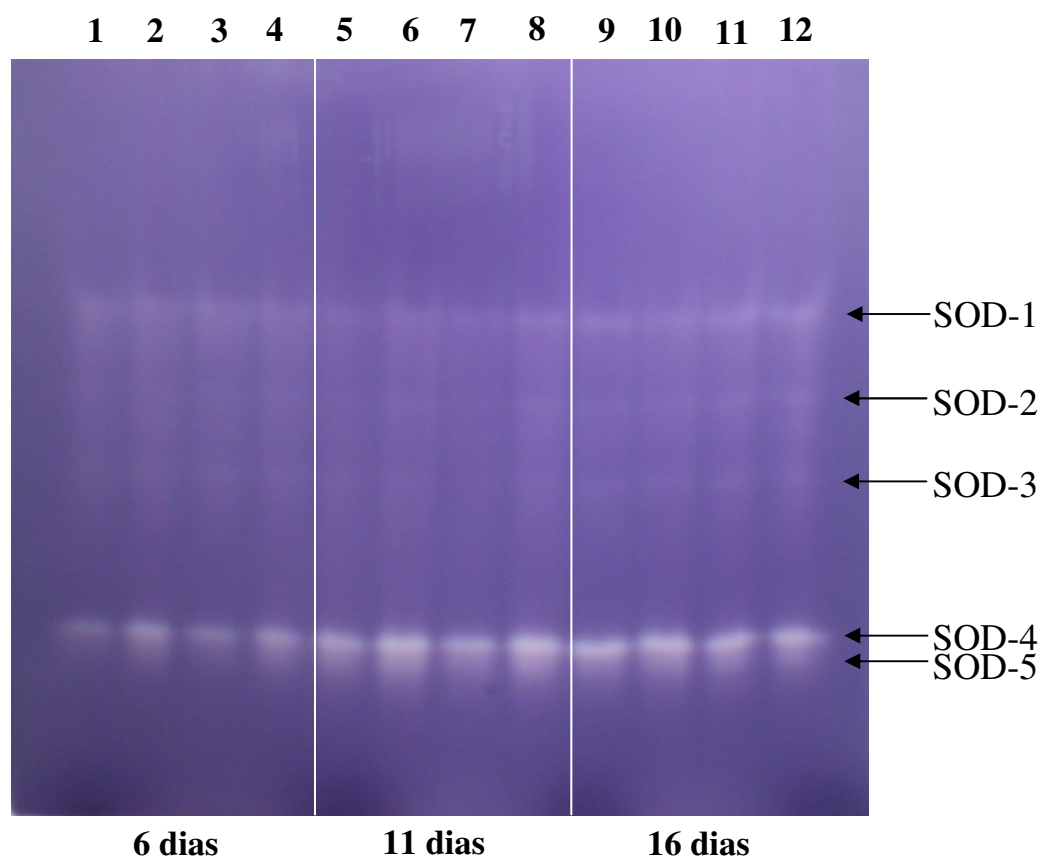
**Figura 13.** Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM, sob condições salinas, em relação àquelas provenientes de plantas pré-tratadas com água pode, pelo menos em parte, ser responsável pela melhoria no crescimento observado nas plantas desse tratamento (Figuras 8 e 9). Os resultados aqui apresentados foram concordantes com os de Azevedo Neto *et al.* (2005), que também observaram uma melhoria no crescimento das plantas quando essas foram tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 1  $\mu\text{M}$  no meio de crescimento das plantas, fato atribuído, pelo menos em parte, ao aumento em atividade da SOD e conseqüentemente maior capacidade de eliminação do radical superóxido.

Estudos comparativos entre cultivares ou genótipos com tolerância diferencial à salinidade tentam elucidar o papel da SOD na tolerância ao estresse salino. Demiral e Türkan (2005), não observaram modificações pela salinidade na atividade da SOD em cultivares de *Oriza sativa* L. com diferentes graus de tolerância ao estresse salino. Por outro lado, Vaidyanathan *et al.* (2003) observaram uma maior atividade da SOD em um cultivar sensível de *Oriza sativa* L. submetido à salinidade, enquanto Sairam *et al.* (2002), em estudos com *Triticum aestivum* L., encontraram maior atividade dessa enzima no cultivar tolerante. Tais estudos sugerem que o papel da SOD na tolerância ao estresse ainda é incerto.

#### **5.3.3.1.2. Padrões eletroforéticos de isoenzimas de SOD**

Foram detectadas cinco isoformas de SOD nas folhas das plantas de milho, sendo as isoformas 4 e 5 as principais responsáveis pelas discretas alterações sofridas em virtude dos tratamentos empregados (Figura 14). A isoforma 4 mostrou-se a de maior atividade no zimograma, devido à intensa zona acromática por ela formada. Aos 6 dias, observou-se que as bandas de atividade das isoformas 4 e 5, no tratamento controle/água, se apresentaram com intensidades menores que aquelas dos outros três tratamentos. Aos 11 e 16 dias, as modificações



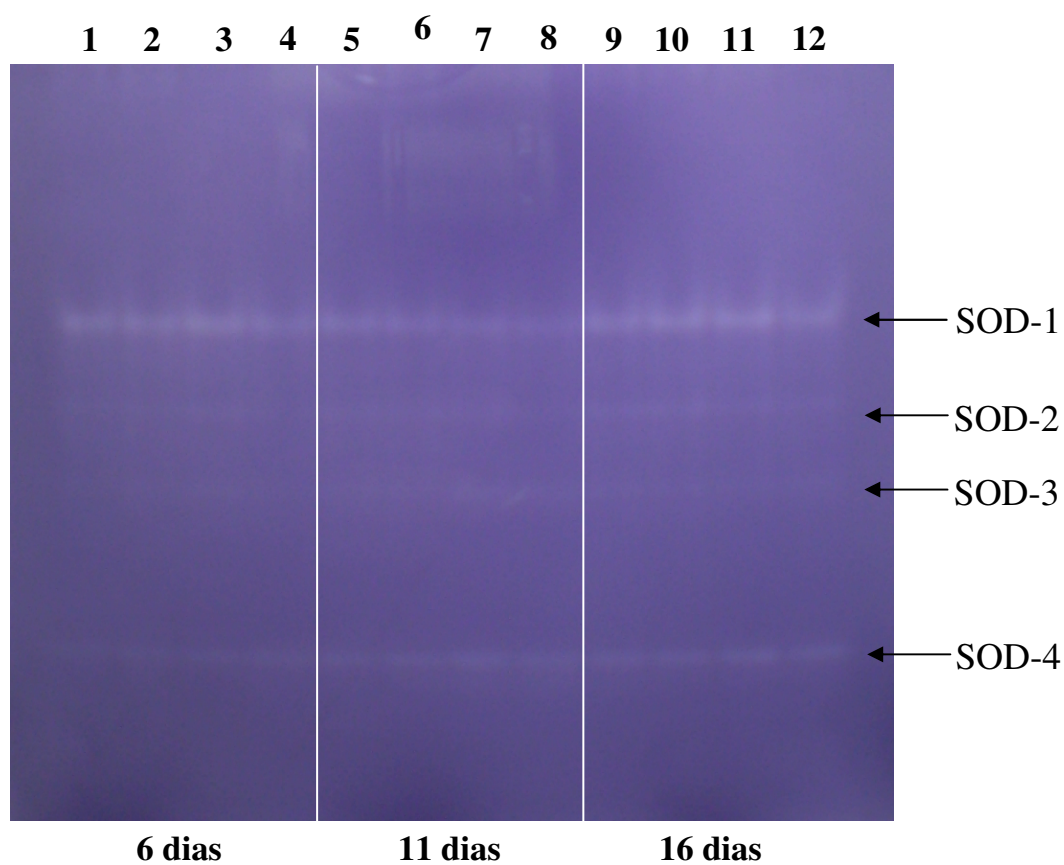
**Figura 14.** Atividade da dismutase do superóxido em gel de poliacrilamida em folhas de plantas de milho crescendo sob condições controle (solução nutritiva) provenientes de sementes embebidas por 36 h em água destilada (poços 1,5 e 9) ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM (poços 2, 6 e 10) e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM) oriundas de sementes embebidas por 36 h em água destilada (poços 3, 7 e 11) ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM (poços 4, 8 e 12), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

sofridas em consequência dos tratamentos empregados foram quase imperceptíveis. Nas raízes, foram encontradas quatro isoformas da SOD, porém não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos empregados (Figura 15).

Comparando-se os padrões eletroforéticos da SOD de sementes (Figura 7), folhas (Figura 14) e raízes (Figura 15) de milho, verificou-se que houve diferenças entre estes. Nas sementes predominou a isoforma SOD-1, entre as seis encontradas; nas folhas destacaram-se as isoformas SOD-4 e SOD-5, entre as 5 observadas, enquanto que para raízes, houve uma maior atividade da isoforma SOD-1, entre as 4 detectadas.

Os resultados obtidos para a SOD por eletroforese em gel de poliacrilamida foram diferentes daqueles de atividade enzimática detectados por meios espectrofotométricos (Figura 13A). É possível que as diferentes sensibilidades dos métodos, bem como o uso de apenas uma amostra nas eletroforeses e não a média das cinco amostras, como no método espectrofotométrico, sejam responsáveis pelas desigualdades encontradas.

Lee *et al.* (2001), estudando as isoenzimas de SOD em plântulas de arroz submetidas à salinidade, constataram a presença de duas isoformas da Mn-SOD e cinco da Cu/Zn-SOD, sendo a expressão da Cu/Zn-SOD-1, Cu/Zn-SOD-2 e Mn-SOD-2, em folhas, as principais responsáveis pelo aumento de atividade em consequência da salinidade. Nas raízes, foram encontradas poucas alterações em virtude da salinidade. Parida *et al.* (2004b), trabalhando com *Bruguiera parviflora* cultivada hidroponicamente em níveis crescentes de salinidade, constataram a presença em folhas de uma isoforma de Mn-SOD, uma de Cu/Zn-SOD e três de Fe-SOD. As isoformas Mn-SOD e Fe-SOD-2 foram preferencialmente elevadas pela salinidade.



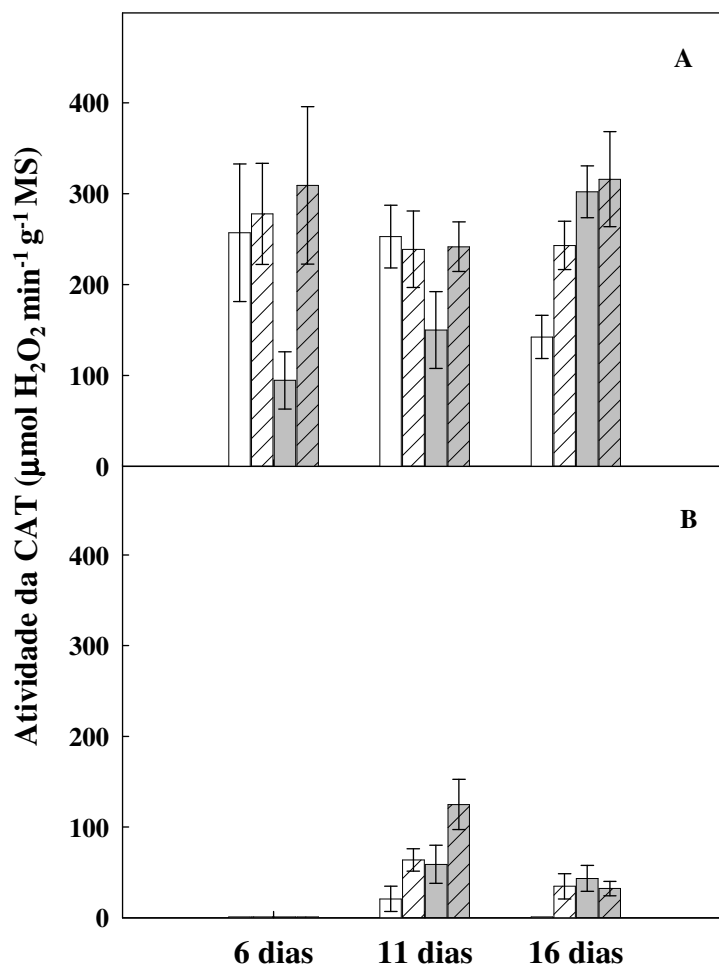
**Figura 15.** Atividade da dismutase do superóxido em gel de poliacrilamida em raízes de plantas de milho crescendo sob condições controle (solução nutritiva) provenientes de sementes embebidas por 36 h em água destilada (poços 1,5 e 9) ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM (poços 2, 6 e 10) e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM) oriundas de sementes embebidas por 36 h em água destilada (poços 3, 7 e 11) ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM (poços 4, 8 e 12), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

### 5.3.3.2. Atividade da catalase

A atividade da CAT, nas folhas, foi reduzida em consequência da salinidade em plantas aos 6 e 11 dias de idade (Figura 16A), sendo os valores de atividade dos tratamentos salinos/água, respectivamente, inferiores aos respectivos controles em 65 e 39%. Porém, em plantas com essas mesmas idades, observou-se que o pré-tratamento com  $H_2O_2$  mostrou-se eficiente na reversão desses efeitos, visto que nas plantas do tratamento salino/ $H_2O_2$  as atividades alcançaram níveis semelhantes aos seus controles. Verificou-se, ainda, que o tratamento salino/ $H_2O_2$  apresentou atividade superior ao salino/água em 229 e 61%, aos 6 e 11 dias, respectivamente. Já aos 16 dias, o tratamento controle/ $H_2O_2$  foi superior ao controle/água em 71%, sendo este último inferior à média dos tratamentos salinos em 54% (Figura 16A).

Nas raízes das plantas com 6 dias, não foram detectados níveis significativos de atividade da CAT, em nenhum dos tratamentos empregados (Figura 16B). Aos 11 dias, constatou-se que essa atividade no tratamento controle/ $H_2O_2$  foi 207% superior àquela do controle/água, e que a maior atividade foi obtida no tratamento salino/ $H_2O_2$ , a qual se mostrou 112% mais elevada do que aquela no tratamento salino/água. Aos 16 dias, não foi detectada atividade na CAT no tratamento controle/água, enquanto que os demais tratamentos apresentaram atividades semelhantes, não diferindo significativamente entre si. Em média, os valores de atividade da CAT nas raízes foram 80% menores que aqueles nas folhas.

A CAT é uma das principais enzimas removedoras de  $H_2O_2$  (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003) o qual pode levar à formação do radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), causando a peroxidação dos lipídios (LOGGINI *et al.*, 1999) e das membranas celulares, prejudicando o crescimento das plantas. Portanto, o grande aumento em atividade da CAT, principalmente nas folhas das plântulas no início de seu estabelecimento (6 dias de idade), (Figura 15A) induzido pelo pré-



**Figura 16.** Atividade da catalase (CAT) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

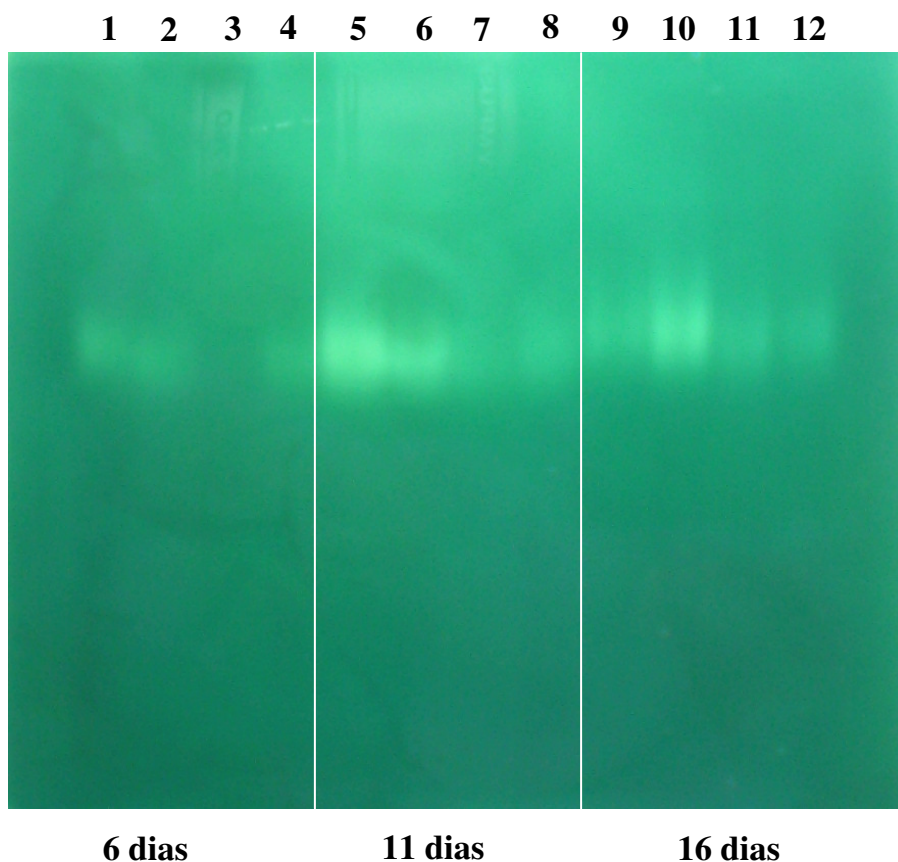


tratamento das sementes com  $H_2O_2$ , pode ter contribuído para minimizar os efeitos deletérios da salinidade no crescimento das plantas (Figuras 8 e 9).

Alguns autores, comparando cultivares ou genótipos tolerantes e sensíveis de *Triticum aestivum* L. (SAIRAM *et al.*, 2002), *Beta vulgaris* (BOR *et al.*, 2003) e *Oriza sativa* L. (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003; DEMIRAL & TÜRKAN, 2005), observaram aumentos significativos na atividade da CAT nos genótipos tolerantes em resposta ao estresse salino. Por outro lado, Lee *et al.* (2001), trabalhando com *Oriza sativa* L., e Parida *et al.* (2004b), com *Bruguiera parviflora*, encontraram diminuições na atividade de CAT das plantas crescendo sob condições salinas, o que dificulta o entendimento preciso dessa enzima no processo de aclimação à salinidade. No entanto, Azevedo Neto *et al.* (2005), observaram um grande aumento na atividade da CAT, em plantas submetidas ao pré-tratamento com  $H_2O_2$  logo aos dois dias do início do tratamento de estresse.

#### **5.3.3.2.1. Padrões eletroforéticos de isoenzimas de CAT**

Pela metodologia empregada, não foram detectadas nos géis de poliacrilamida bandas correspondentes a isoenzimas de CAT nas raízes das plantas de milho em nenhum dos tratamentos empregados (resultados não apresentados). A Figura 17 mostra o efeito da salinidade nas bandas de atividade da CAT em gel de poliacrilamida sob condições nativas em folhas de plantas de milho aos 6, 11 e 16 dias de idade, provenientes de sementes embebidas por 36 h em água destilada ou em  $H_2O_2$  a 100 mM. Assim como encontrado para as sementes, apenas uma isoforma dessa enzima em extratos de folhas foi detectada nos géis. Aos 6 dias, observaram-se zonas acromáticas representativas de atividade semelhantes entre os tratamentos, com exceção para o tratamento salino/água, cuja banda de atividade da CAT pareceu estar ausente. Aos 11



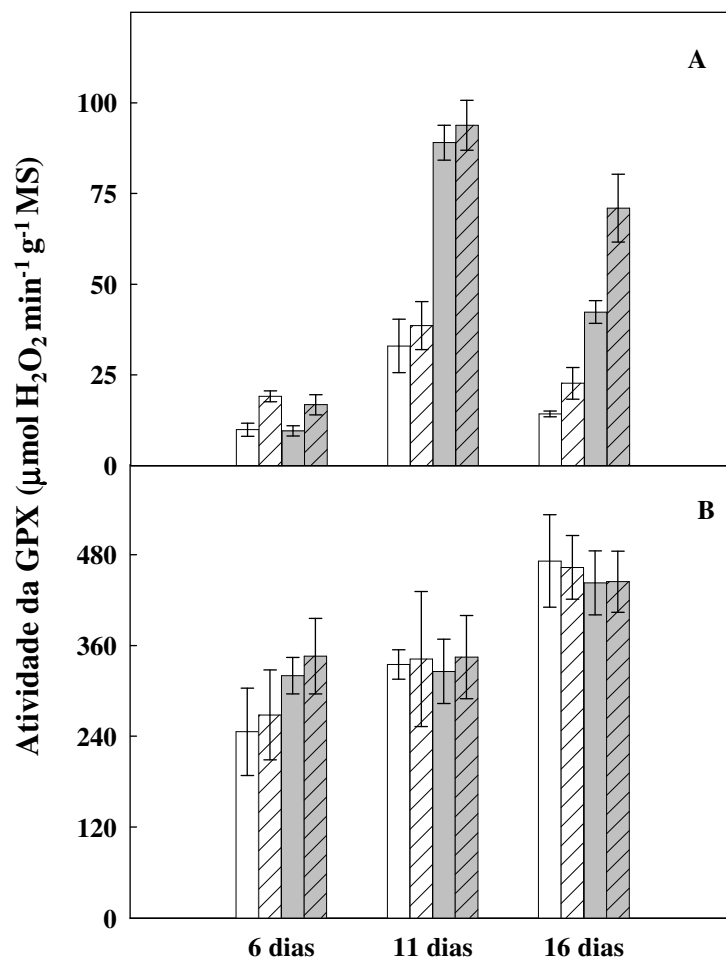
**Figura 17.** Atividade da catalase em gel de poliacrilamida em folhas de plantas de milho crescendo sob condições controle (solução nutritiva) provenientes de sementes embebidas por 36 h em água destilada (poços 1,5 e 9) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (poços 2, 6 e 10) e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM) oriundas de sementes embebidas por 36 h em água destilada (poços 3, 7 e 11) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (poços 4, 8 e 12), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

dias, observou-se maior intensidade da isoforma de CAT no tratamento controle/água, seguido daquela do controle/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nos tratamentos salinos, as atividades foram aparentemente menores do que nos controles, sendo visualizada a menor zona acromática no tratamento salino/água. Aos 16 dias, a banda de maior intensidade de atividade foi detectada no tratamento controle/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não sendo perceptíveis diferenças nas intensidades dessas bandas nos demais tratamentos.

El-baky *et al.* (2003), trabalhando com folhas de três cultivares de cebola com tolerância diferencial à salinidade, também encontraram apenas uma isoforma de CAT, que exibiram diferentes intensidades. O cultivar considerado tolerante à salinidade sofreu diminuição na intensidade da banda quando exposto à concentrações crescentes de NaCl, entretanto, esta manteve-se ainda elevada como nos cultivares sensíveis. Os resultados encontrados pelos autores, em gel de poliacrilamida, também diferiram daqueles obtidos por métodos espectrofotométricos. Parida *et al.* (2004b), trabalhando com *Bruguiera parviflora* cultivada hidroponicamente em níveis crescentes de salinidade, constataram a presença de quatro isoformas distintas da CAT, com pesos moleculares variando de 59.800 a 198.800, sendo a intensidade das bandas de isoformas no gel diminuídas pela exposição ao sal. Esse resultado foi concordante com a diminuição em atividade observada por esses autores quando os extratos enzimáticos foram dosados espectrofotometricamente.

#### **5.3.3.3. Atividade da GPX**

Aos 6 dias, observou-se que a atividade da GPX nas folhas foi maior nos tratamentos provenientes de sementes embebidas em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 18A). Os valores obtidos no tratamento controle/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram 93% superiores àqueles do controle/água, enquanto que em plantas do tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esses valores apresentaram-se 75% mais elevados do que no salino/água.



**Figura 18.** Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

Com 11 dias, a média dos tratamentos salinos foi 155% superior àquela dos tratamentos controles, não havendo diferenças significativas entre plantas oriundas de sementes embebidas em água ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aos 16 dias, o tratamento controle/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou atividade 59% mais elevada do que o controle/água, verificando-se ainda que a salinidade aumentou a atividade da GPX, sendo o valor mais elevado observado no tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual foi 68% superior ao do tratamento salino/água. Nas raízes (Figura 18B), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos diferentes tempos de coleta. Entretanto, os resultados mostraram que a atividade da GPX nas raízes foi, em média, 9,5 vezes maior do que nas folhas.

Analisando-se os resultados da atividade da GPX em folhas, observa-se que, embora o pré-tratamento de embebição de sementes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tenha causado aumento em atividade dessa enzima, em plantas com 6 dias de idade, isto se deveu principalmente ao peróxido de hidrogênio. Já os resultados, com plântulas aos 11 dias de idade, sugerem que o aumento em atividade da GPX foi devido apenas à salinidade, enquanto que aos 16 dias, o aumento em atividade da GPX ocorreu tanto em função da salinidade, como em resposta ao pré-tratamento de embebição das sementes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM. Este último resultado foi concordante com os observados por Azevedo Neto *et al.* (2005), em plantas de milho pré-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na solução nutritiva.

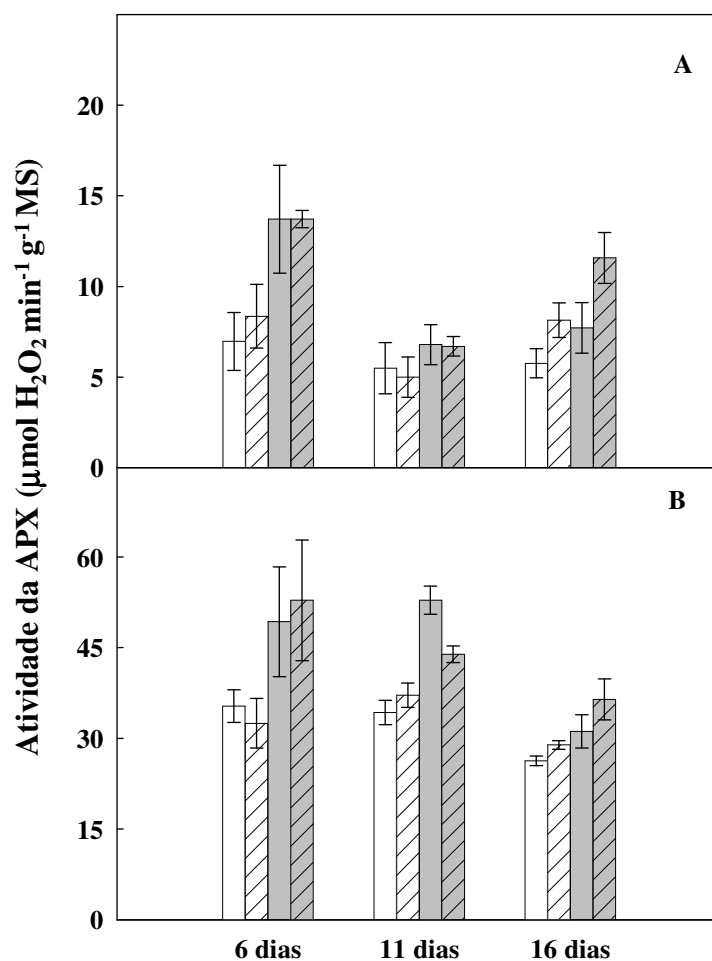
Vaidyanathan *et al.* (2003), estudando os efeitos da salinidade em dois cultivares de *Oriza sativa* L. com tolerância diferencial ao estresse salino, verificaram que a atividade da GPX aumentou em ambos os cultivares. Lee *et al.* (2001), também com *Oriza sativa* L. e Parida *et al.* (2004b), com *Bruguiera parviflora*, de forma semelhante observaram aumentos na atividade dessa enzima em função da salinidade. Parida *et al.* (2004b) concluíram, ainda, que o aumento em atividade da GPX parece estar relacionado com o tempo de estresse e com a concentração de sal empregada.

#### 5.3.3.4. Atividade da APX

Aos 6 dias, a atividade de APX nas folhas (Figura 19A) aumentou em consequência apenas da salinidade, sendo a média dos tratamentos salinos 79% superior à dos tratamentos controles. Aos 11 dias, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Já aos 16 dias, detectou-se que o tratamento controle/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou uma atividade 41% superior àquela do controle/água, e que o tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi o que apresentou o maior valor em atividade, quando se observou um aumento de 50% em atividade da APX em relação ao salino/água.

Com relação às raízes de plantas com 6 dias, o comportamento da atividade da APX (Figura 19B) foi semelhante aos das folhas, havendo um aumento de 51%, em média, em relação aos tratamentos controle, sendo esse aumento em decorrência apenas da salinidade. Aos 11 dias, não houve diferenças significativas entre os tratamentos controle, entretanto, comparando-se os tratamentos salinos, observou-se que a atividade da APX no tratamento salino/água foi 20% superior àquela do salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 48% mais elevada que a média das atividades dos controles. Aos 16 dias, não houve diferenças marcantes entre os tratamentos, sendo observada apenas uma tendência de aumento em virtude do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da salinidade. Contudo, o tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou o maior valor em atividade, sendo 32% maior que a atividade média dos tratamentos controle. A atividade da APX nas raízes foi, em média, 4,7 vezes maior do que nas folhas.

A APX é uma importante enzima do sistema antioxidativo que atua reduzindo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à água usando o ascorbato como agente redutor (ASADA, 1992). Essa enzima representa um importante componente que visa prevenir o estresse oxidativo em organismos fotossintetizantes. Alguns estudos ressaltam a importância da APX no controle da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na



**Figura 19.** Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

sinalização intracelular de plantas expostas à condições de estresse e ao ataque de patógenos (SHIGEOKA *et al.*, 2002).

A atividade da APX, juntamente com as de outras enzimas do sistema antioxidante, tais como a CAT, a SOD e a redutase da glutathiona (GR), geralmente aumenta em resposta a estresses ambientais, sugerindo que os componentes de eliminação das ROS são co-regulados (SHIGEOKA *et al.*, 2002).

Algumas observações têm sido feitas em relação à expressão gênica das APXs em resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lee *et al.* (1999) observaram que o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em culturas de células de soja, resultou em alterações nos níveis dos transcritos da APX citosólica. Estudos posteriores feitos por Shigeoka *et al.* (2002) sugerem que os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentam a expressão gênica das APXs citosólicas.

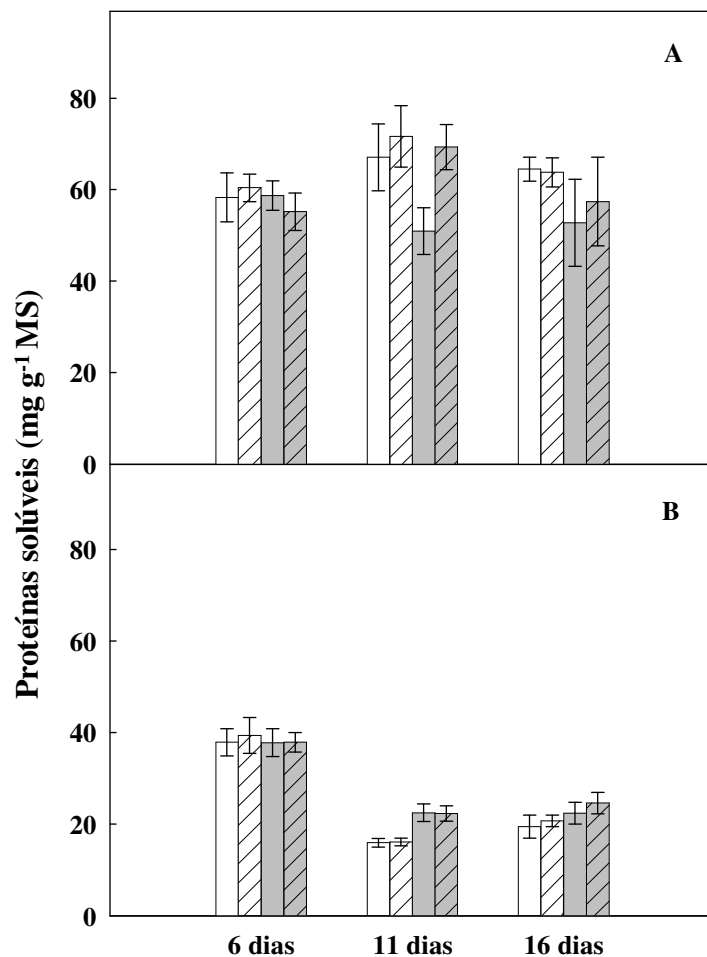
No presente trabalho, constatou-se que a CAT se mostrou a principal enzima eliminadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas folhas de milho, por outro lado, nas raízes, essa função foi desempenhada pela GPX.

#### **5.3.4. Solutos orgânicos**

##### **5.3.4.1. Proteínas solúveis**

A Figura 20 mostra o efeito da salinidade nos teores de proteínas solúveis em folhas e raízes de plantas de milho aos 6, 11 e 16 dias de idade em função dos tratamentos empregados. Em média, os teores de proteína nos diversos tratamentos foram aproximadamente os mesmos nos três tempos de coleta das plantas. Aos 11 dias, observou-se uma redução de 27% nos teores de proteínas solúveis do tratamento salino/água, em relação ao controle/água. Todavia, o pré-





**Figura 20.** Teores de proteína em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

tratamento das sementes com  $H_2O_2$  reverteu em parte essa redução nos teores de proteínas solúveis.

Com relação às raízes, aos 6 dias, não foram encontradas diferenças significativas nos teores de proteínas solúveis entre os tratamentos (Figura 20B). Porém, esses valores foram, em média, 81% maiores do que a média daqueles observados em plantas com 11 e 16 dias. Nas plantas com 11 dias, observou-se um aumento de 40% nos teores de proteínas solúveis, em virtude apenas da salinidade, não havendo diferenças entre as plantas provenientes de sementes embebidas em água destilada e aquelas com  $H_2O_2$ . Aos 16 dias, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos empregados.

Em plantas submetidas a estresse salino, geralmente, se verifica uma redução na quantidade total de proteínas (GILBERT *et al.*, 1998; WANG; NIL, 2000; PARIDA *et al.*, 2004a), embora algumas proteínas possam ser induzidas (HURKMAN *et al.*, 1989; ALI *et al.*, 1999; MANSOUR, 2000). No presente trabalho, as modificações nos teores de proteínas pela salinidade foram relativamente pequenas e o pré-tratamento com o peróxido de hidrogênio teve pouco efeito. As proteínas que são induzidas pela salinidade têm sido identificadas em plantas, sendo classificadas em dois grupos distintos: proteínas específicas do estresse salino, que se acumulam apenas em presença de salinidade e proteínas associadas a estresses que se acumulam em resposta à salinidade e a outros estresses tais como calor, frio, seca e elevadas ou baixas concentrações de nutrientes (ASHRAF; HARRIS, 2004). Uchida *et al.* (2002), trabalhando com plantas de arroz cultivadas em solução nutritiva contendo NaCl a 100 mM, constataram que o pré-tratamento com  $H_2O_2$  nas concentrações de 1, 10 e 100 mM reverteu parcialmente a redução no crescimento causada pela salinidade e que o  $H_2O_2$  contribuiu para a tolerância, induzindo a expressão de genes relacionados ao estresse. De acordo com Singh *et al.* (1987), algumas

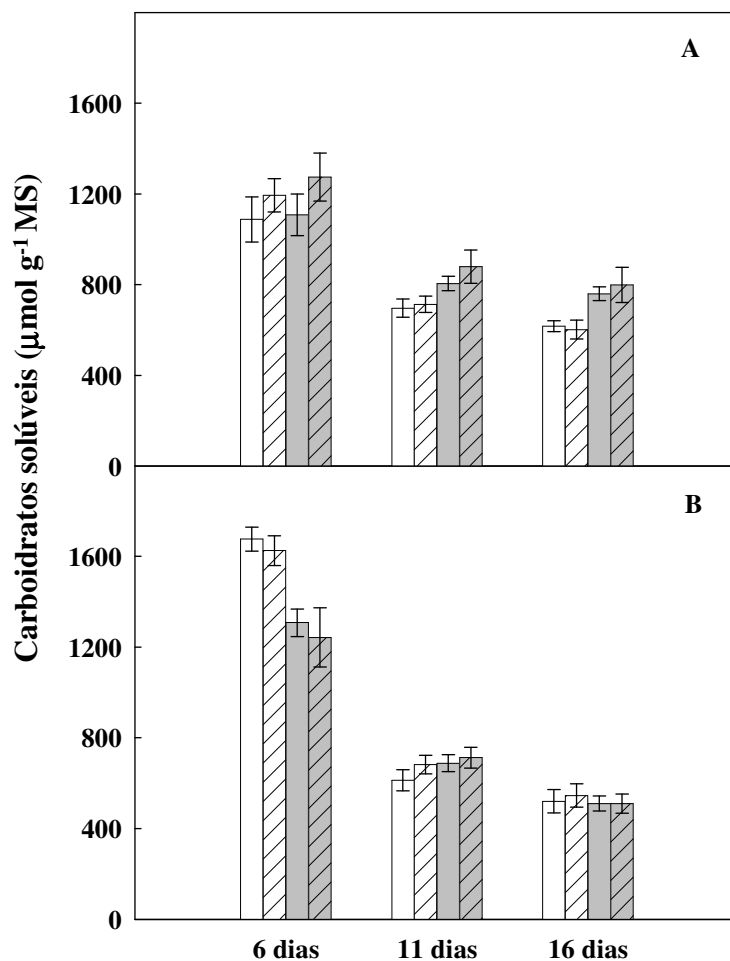
proteínas que se acumulam em plantas crescendo sob condições salinas podem funcionar como uma reserva de nitrogênio para ser utilizada quando o estresse chegar ao fim.

#### **5.3.4.2. Carboidratos solúveis**

Os teores de carboidratos solúveis nas folhas das plantas com 6 dias de idade foram, em média, 59% maiores que aqueles em plantas com 11 e 16 dias. Além disso, não houve diferença significativa entre os tratamentos empregados (Figura 21A). Aos 11 e 16 dias, observaram-se aumentos de 19 e 28% nestes teores, respectivamente, em consequência da salinidade, não havendo influência do pré-tratamento de embebição das sementes por 36 h em  $H_2O_2$  a 100 mM.

Os mais elevados teores de carboidratos solúveis nas raízes (Figura 21B) foram encontrados nas plantas com 6 dias, sendo em média, 144% superiores a média daqueles observados em plantas com 11 e 16 dias de idade, os quais, por sua vez, diferiram muito pouco entre si. Aos 6 dias, observou-se, ainda, uma redução de 23% nesses teores, em razão da salinidade, independente do pré-tratamento das sementes com  $H_2O_2$ . Aos 11 e 16 dias, não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Azevedo Neto *et al.* (2004), trabalhando com oito genótipos de milho, observaram que os teores de carboidratos solúveis nas folhas e raízes, de modo geral, foram reduzidos ou permaneceram inalterados pela salinidade, enquanto que para um dos genótipos foi observado um aumento nesses teores pelo estresse salino nas folhas. Kerepesi e Galiba (2000), trabalhando com quatro genótipos de trigo crescendo sob condições salinas, observaram que os mais tolerantes apresentaram níveis mais elevados de carboidratos solúveis. Por outro lado, Costa *et al.* (2003), trabalhando com sete cultivares de feijão-de-corda com tolerância diferencial à salinidade, crescendo em solução nutritiva contendo NaCl a 75 mM, constataram que os níveis de



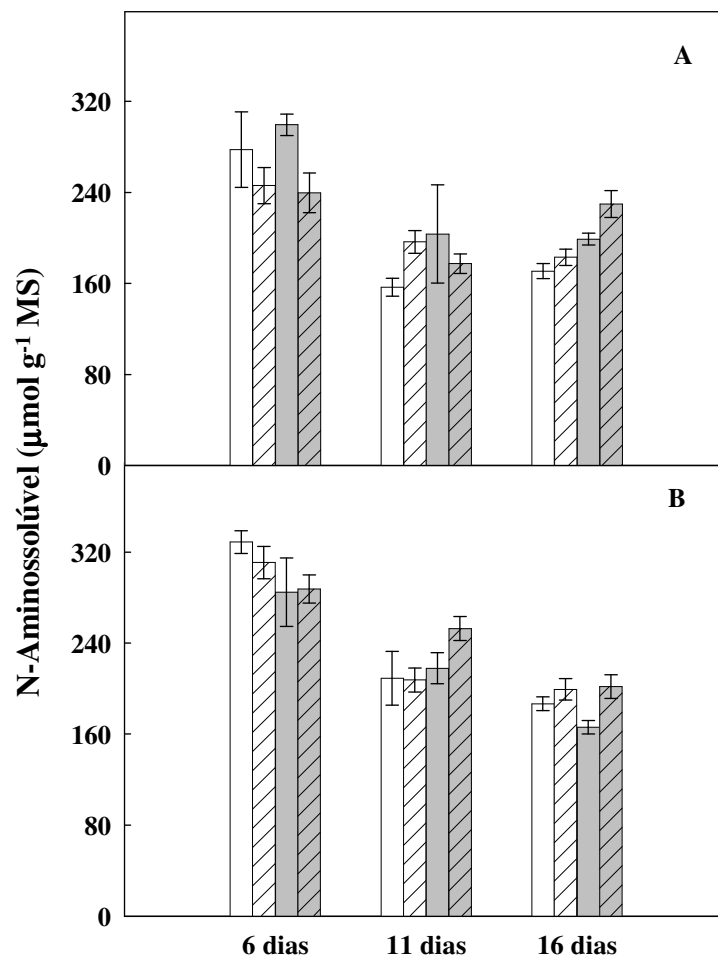
**Figura 21.** Teores de carboidratos solúveis em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

carboidratos solúveis nas folhas não foi alterado pela salinidade. Porém, nas extremidades das raízes estes autores observaram que os teores desses osmólitos foram reduzidos, não sendo, contudo, observada correlação entre tolerância à salinidade e níveis de carboidratos solúveis.

#### **5.3.4.3. N-aminossolúveis**

Os teores de N-aminossolúveis nas folhas das plantas com 6 dias crescendo em ausência de salinidade não sofreram grandes alterações em consequência do pré-tratamento de embebição das sementes com  $H_2O_2$  (Figura 22A). Entretanto, esses teores no tratamento salino/água mostraram-se 25% superiores àqueles do salino/ $H_2O_2$ . Aos 11 dias, o tratamento controle/ $H_2O_2$  mostrou um acréscimo de 25% nos teores de N-aminossolúveis, em relação ao controle/água, enquanto os tratamentos salinos apresentaram valores semelhantes entre si, não diferindo significativamente do tratamento controle/ $H_2O_2$ . Aos 16 dias, não houve diferença significativa entre os teores de N-aminossolúveis em folhas das plantas sob condições controle, independente das sementes terem sido ou não pré-tratadas com  $H_2O_2$ . Porém, no tratamento salino/ $H_2O_2$  foi onde se observou o maior teor em N-aminossolúveis, sendo 21 e 30%, respectivamente, maior que o do tratamento salino/água e à média dos controles.

Nas raízes (Figura 22B) das plantas com 6 dias de idade verificou-se que a média dos teores de N-aminossolúveis dos tratamentos salinos mostrou-se 13% inferior ao valor observado no tratamento controle/água. Aos 11 dias, o único tratamento que diferiu significativamente dos demais foi também o salino/ $H_2O_2$ , que apresentou valores superiores em 16 e 21%, em relação ao tratamento salino/água e à média dos controles, respectivamente. Aos 16 dias, não foram visualizadas diferenças significativas entre os tratamentos, excetuando-se o tratamento



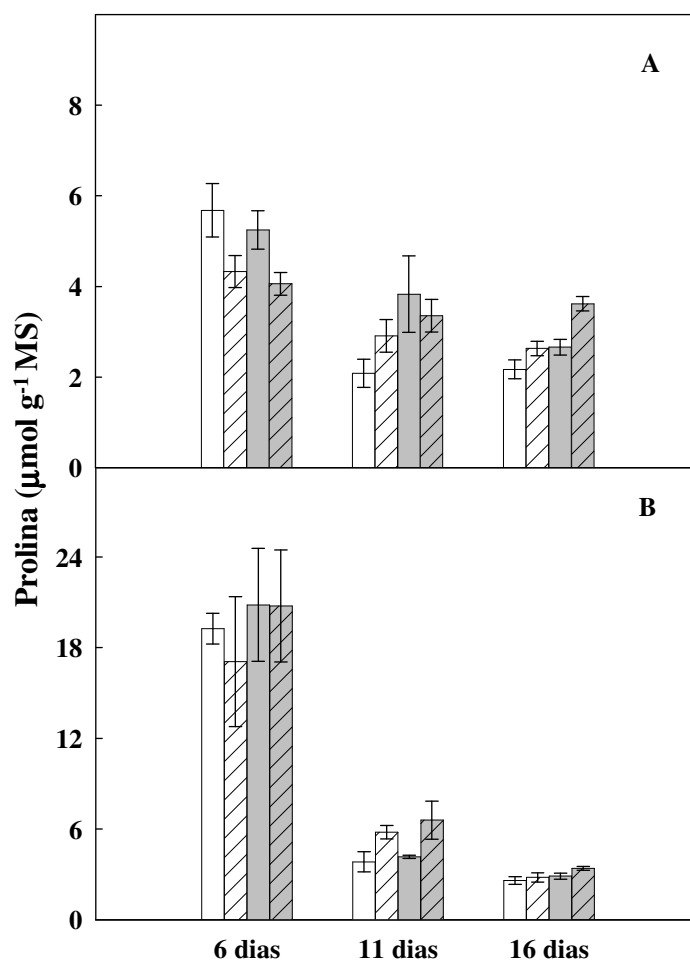
**Figura 22.** Teores de N-aminossolúveis em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

salino/água que apresentou uma redução de 11% nesse parâmetro, em relação ao controle/água, entretanto, o pré-tratamento das sementes com  $H_2O_2$  reverteu essa redução (Figura 21B).

Uma grande variedade de compostos nitrogenados solúveis de baixa massa molecular pode ser encontrada em plantas expostas à salinidade. Os mais frequentes são os aminoácidos, os iminoácidos, os compostos de amônio quaternário e as poliaminas (PARIDA; DAS, 2005). O acúmulo destes compostos pode estar relacionado com a tolerância à salinidade das plantas (MANSOUR, 2000). Azevedo Neto *et al.* (2004), estudando genótipos de milho com tolerância diferencial à salinidade, observaram níveis mais elevados de N-aminossolúveis no genótipo considerado mais tolerante. Por outro lado, Costa *et al.* (2003) trabalhando com extremidades de raízes de plantas de feijão-de-corda submetidas à salinidade, não verificaram aumento significativo, em relação ao controle, nos teores de N-aminossolúveis, independente do grau de tolerância entre os sete cultivares estudados. No presente trabalho, os teores de N-aminossolúveis foram pouco afetados pela salinidade e o pré-tratamento das sementes com  $H_2O_2$  teve pouca influência nessa resposta.

#### **5.3.4.4. Prolina**

Nas folhas das plantas com 6 dias, os teores de prolina foram menores naquelas oriundas de sementes pré-tratadas com  $H_2O_2$  (Figura 23A). Esses teores no tratamento controle/ $H_2O_2$  apresentaram-se 25% menores que no controle/água, enquanto que no tratamento salino/ $H_2O_2$ , foi observada uma redução de 23%, em relação ao salino/água. Aos 11 dias, verificou-se um aumento de 40% nos teores de prolina nas folhas das plantas do tratamento controle/ $H_2O_2$ , em comparação com o controle/água, e que a média dos tratamentos salinos mostrou-se 71% superior ao valor apresentado no tratamento controle/água. Aos 16 dias, não houve diferenças



**Figura 23.** Teores de prolina em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.



significativas entre os tratamentos, excetuando-se o tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se mostrou 39% superior ao salino/água.

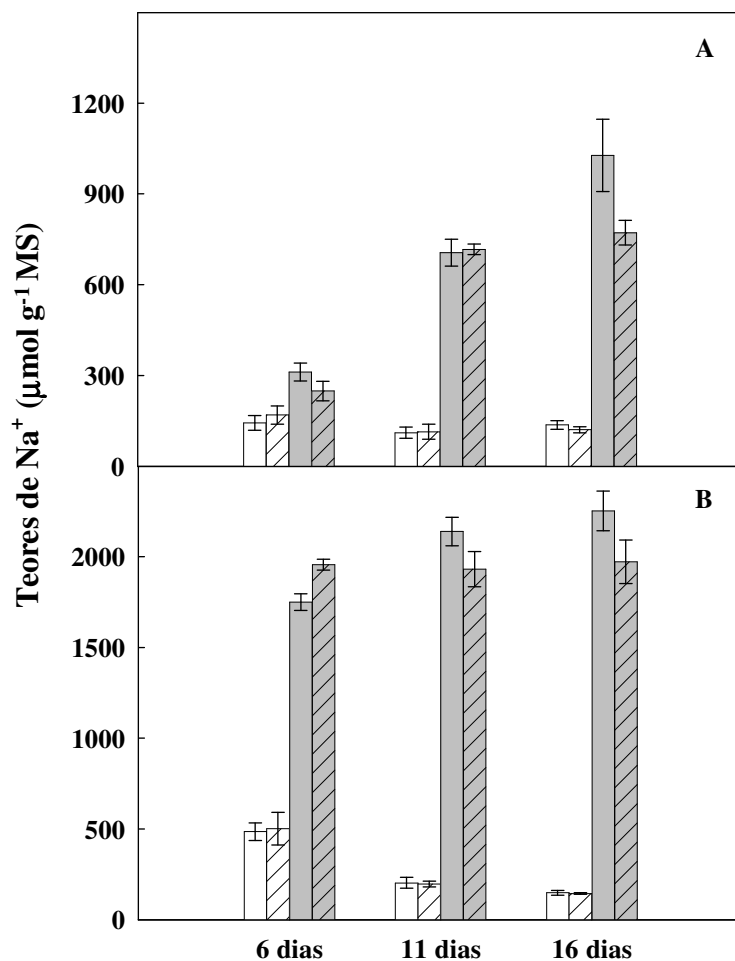
Os teores de prolina nas raízes (Figura 23B) de plantas com 6 dias de idade foram, em média, 4,8 vezes maiores que aqueles em plantas com 11 e 16 dias. Além disso, não houve diferença significativa entre os tratamentos empregados. Aos 11 dias, os valores obtidos no tratamento controle/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram 53% superiores àqueles do controle/água, enquanto no tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, houve um aumento de 58%, em relação ao salino/água. Já aos 16 dias, não houve diferença significativa entre os tratamentos, excetuando-se o tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que apresentou valores 17% superiores àqueles do salino/água.

Da mesma forma que para os N-aminossolúveis, os teores de prolina foram pouco afetados pela salinidade e o pré-tratamento das sementes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teve pouca influência nessa resposta, embora alguns autores tenham observado um rápido acúmulo de prolina livre em plantas sob estresse salino (DEMIRAL; TÜRKAN, 2005). Mansour (1998) propôs que a prolina exerce um importante papel na proteção de membranas celulares de cebola às injúrias promovidas pela salinidade. Em muitos estudos tem se verificado uma correlação positiva entre o acúmulo deste soluto e a tolerância a estresses (HSU *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2003). Entretanto, Vaidyanathan *et al.* (2003), trabalhando com dois cultivares de arroz com tolerância diferencial à salinidade, encontraram níveis extremamente mais elevados de prolina no cultivar considerado sensível, inferindo-se, dessa forma, que a acumulação de prolina não exerce função prioritária no combate ao estresse salino, parecendo ser simplesmente uma resposta da planta ao estresse. Portanto, o papel da prolina como osmoprotetor ou como osmorregulador em plantas sujeitas ao estresse salino ainda é controverso (DEMIRAL; TÜRKAN, 2005).

### 5.3.5. Solutos inorgânicos

A Figura 24 destaca o efeito da salinidade nos teores de  $\text{Na}^+$  em folhas e raízes de plantas de milho, aos 6, 11 e 16 dias de idade, provenientes de sementes pré-tratadas por embebição, por 36 h, com água destilada ou solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM. Os teores de  $\text{Na}^+$ , nas folhas, foram alterados apenas em função da salinidade, sendo os valores médios dos tratamentos salinos, respectivamente, iguais a 2, 6 e 7 vezes àqueles das médias dos respectivos controles, aos 6, 11 e 16 dias de idade (Figura 24A). Aos 16 dias de idade, verificou-se que os teores desse íon nas plantas do tratamento salino/ $\text{H}_2\text{O}_2$  foram 25% inferiores àqueles do salino/água, não havendo diferenças significativas entre as plantas dos tratamentos controle. Aumentos nos teores de  $\text{Na}^+$  nas folhas pela salinidade têm sido observados por diversos autores (COSTA *et al.*, 2003; LACERDA *et al.*, 2003; AZEVEDO NETO *et al.*, 2004). Wahid *et al.* (2007), trabalhando com plantas de trigo provenientes de sementes pré-tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e crescendo sob condições salinas, constataram diminuições nos teores de  $\text{Na}^+$  em comparação com as plantas salinizadas provenientes de sementes não pré-tratadas. Os resultados aqui apresentados, pelo menos com plantas aos 16 dias, foram concordantes com os observados por esses autores.

Nas raízes (Figura 24B), em média, os teores de  $\text{Na}^+$  nas plantas submetidas à salinidade mostraram-se 3, 9 e 13 vezes superiores àqueles das plantas controle, aos 6, 11 e 16 dias, respectivamente. Entretanto, aos 6 dias, o tratamento salino/ $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentou valores 11% superiores ao salino/água. Aos 11 e 16 dias, as plantas do tratamento salino/ $\text{H}_2\text{O}_2$  acumularam, respectivamente, 10 e 13% menos  $\text{Na}^+$  do que as do tratamento salino/água, sugerindo um efeito benéfico do peróxido de hidrogênio nestas plantas. Comparando-se as médias dos tratamentos salinos, verificou-se que os teores de  $\text{Na}^+$  nas raízes foram 217% superiores àqueles visualizados nas folhas. De forma semelhante aos resultados aqui obtidos, Azevedo Neto *et al.* (2004),



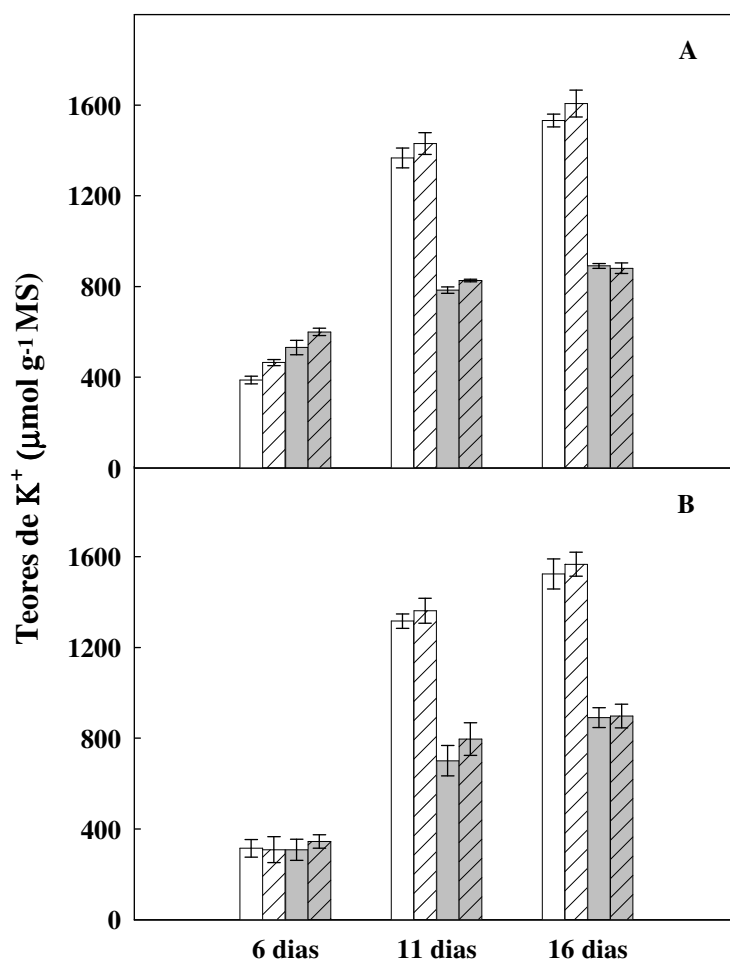
**Figura 24.** Teores de Na<sup>+</sup> em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

encontraram teores mais elevados de  $\text{Na}^+$  em raízes do que em folhas, em oito genótipos de milho estudados sob condições salinas.

Portanto, como observado, os teores de  $\text{Na}^+$  nas raízes sofreram incrementos em consequência da salinidade logo nas plantas aos 6 dias de idade, mantendo-se praticamente constantes ao longo de todo o período experimental (Figura 24B). Já nas folhas, verificaram-se aumentos significativos nos teores desses íons ao longo do tempo (Figura 24A). Comparando-se as médias dos teores de  $\text{Na}^+$  dos tratamentos salinos das plantas com 16 dias com aqueles aos 6 dias, observou-se um incremento de 221%. De forma análoga, Azevedo Neto e Tabosa (2000), trabalhando com dois genótipos de milho cultivados hidroponicamente sob cinco níveis de salinidade, observaram uma tendência de estabilização dos teores de  $\text{Na}^+$  nas raízes a partir da concentração de 25 mM de NaCl.

Os teores de  $\text{K}^+$  nas folhas (Figura 25A) das plantas com 6 dias de idade apresentaram acréscimos em consequência tanto do  $\text{H}_2\text{O}_2$  quanto da salinidade. Os teores deste íon no tratamento controle/ $\text{H}_2\text{O}_2$  mostraram-se 20% superiores àqueles no controle/água, enquanto no tratamento salino/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , houve um aumento de 13%, em relação ao salino/água. Aos 11 e 16 dias, as médias dos tratamentos salinos mostraram-se, respectivamente, 42 e 44% menores que as médias dos tratamentos controles. Nas raízes das plantas com 6 dias de idade, não houve diferença significativa nos teores de  $\text{K}^+$  entre os tratamentos (Figura 25B). Aos 11 e 16 dias, foram observadas reduções nos teores desse íon apenas nas plantas submetidas à salinidade, os quais foram 44 e 45% menores, respectivamente, que as médias dos respectivos controles, não havendo, portanto, efeito do  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos teores desse íon.

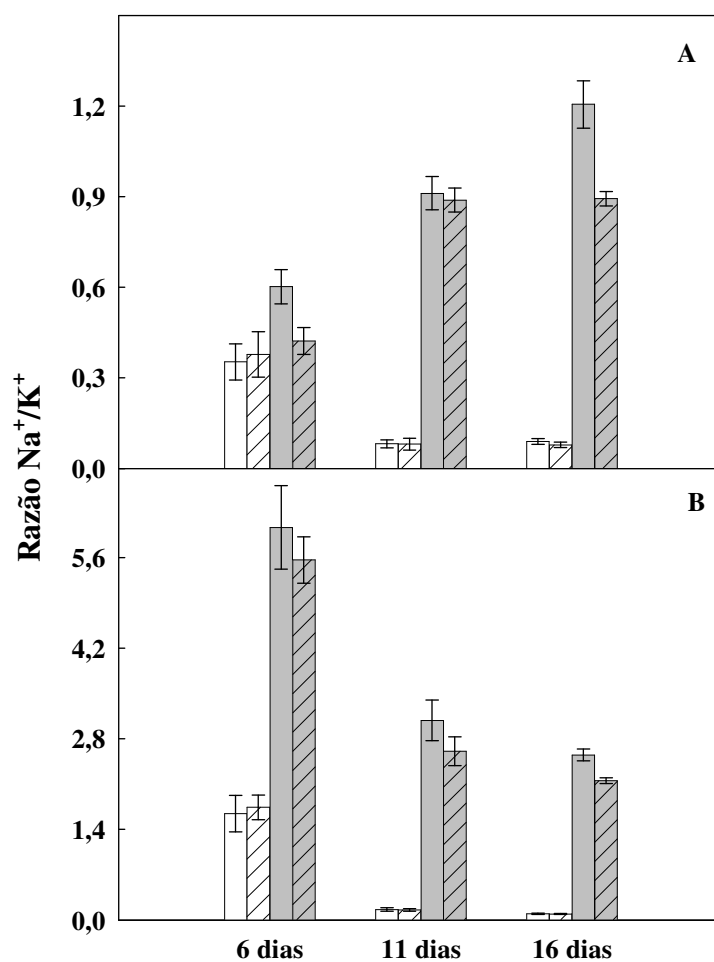
Em condições de estresse salino, os resultados sobre os teores de  $\text{K}^+$  são variados. Enquanto alguns autores observaram aumentos (ERDEI; TALEISNIK, 1993, em milho; SILVA,



**Figura 25.** Teores de  $K^+$  em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em  $H_2O_2$  a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em  $H_2O_2$  a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

2003, em feijão-de-corda), outros observaram diminuições (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004, em milho; LACERDA *et al.*, 2000, em sorgo). De acordo com Flowers (2004), tais resultados contraditórios devem-se a diversos fatores, tais como, manejo da cultura, idade das plantas, intensidade e duração do estresse. Azevedo Neto *et al.* (2004), observaram que a salinidade embora tenha reduzido os teores de  $K^+$  em todas as partes das plantas, nas raízes os teores desse íon atingiram, de modo geral, um estado de equilíbrio a partir de 25 mM de NaCl. Esses autores observaram também que o decréscimo na concentração de  $K^+$  ocorreu simultaneamente à elevação dos teores de  $Na^+$ , assim como verificado no presente trabalho aos 11 e 16 dias (Figuras 24 e 25). Wahid *et al.* (2007), trabalhando com plantas de trigo provenientes de sementes pré-tratadas com  $H_2O_2$  e crescendo sob condições salinas, constataram aumentos nos teores de  $K^+$  em relação às plantas oriundas de sementes não pré-tratadas. Os resultados aqui apresentados, de modo geral, não foram concordantes com os observados por esses autores.

Nas folhas das plantas com 6 dias idade (Figura 26A), não foram encontradas diferenças significativas na razão  $Na^+/K^+$  em nenhum dos tratamentos empregados, excetuando-se o tratamento salino/água, que apresentou valores 43% superiores àqueles do tratamento salino/ $H_2O_2$ . Aos 11 e 16 dias, observaram-se, respectivamente, acréscimos, em média, de 10 e 11 vezes nessa razão nos tratamentos salinos, em comparação com os valores médios dos respectivos tratamentos controles. Aos 16 dias, constatou-se, ainda, uma diminuição de 26% na razão  $Na^+/K^+$  em folhas de plantas do tratamento salino/ $H_2O_2$ , em relação ao salino/água. Os acréscimos na razão  $Na^+/K^+$  ocorreram devido ao aumento nos teores de  $Na^+$  (Figura 24A) e diminuição nos de  $K^+$  (Figura 25A), em consequência da salinidade. As médias das razões  $Na^+/K^+$  nas raízes (Figura 26B) das plantas submetidas à salinidade foram superiores às médias das plantas sob condições controles em 2, 17 e 25 vezes, aos 6, 11 e 16 dias, respectivamente.



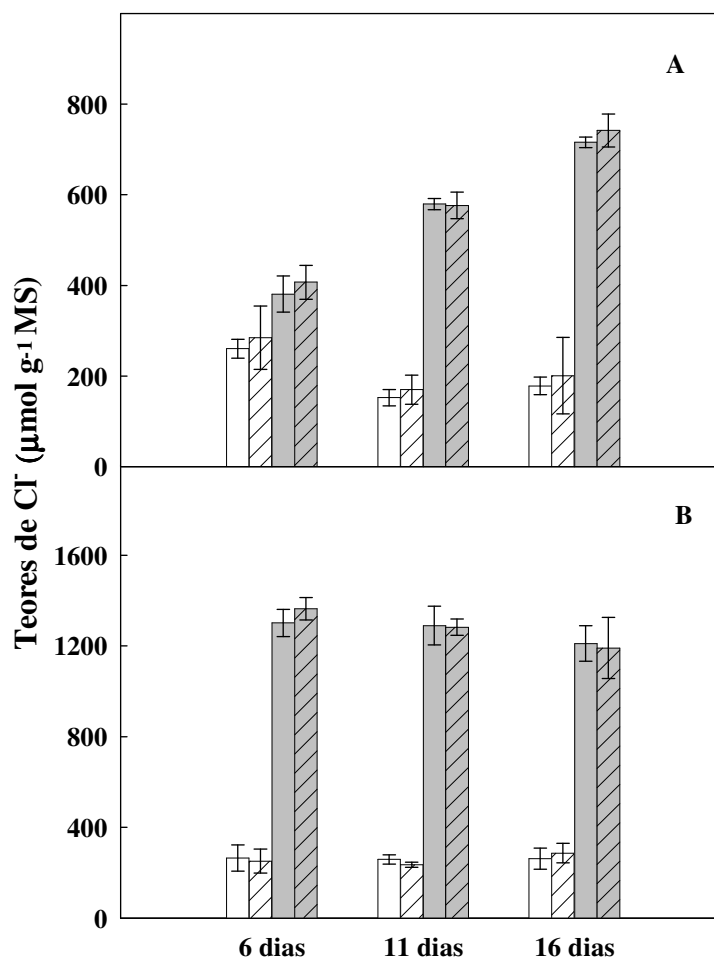
**Figura 26.** Razão entre os teores de  $\text{Na}^+$  e de  $\text{K}^+$  em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

Aos 16 dias, os valores dessa razão no tratamento salino/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostraram-se 16% menores que àqueles do salino/água. Da mesma forma que nas folhas, os aumentos na razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> deveram-se aos aumentos nos teores de sódio e diminuição nos de potássio.

Aumentos na razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, tanto em folhas quanto em raízes de plantas sob salinidade têm sido observados por outros autores (COSTA *et al.*, 2003; LACERDA *et al.* 2005), podendo causar efeitos tóxicos, principalmente afetando as enzimas citosólicas (NIU *et al.*, 1995). O pré-tratamento das sementes de milho com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuiu o valor dessa razão, principalmente, nas folhas, percentualmente essa diminuição foi muito pequena, contudo, é possível que tenha contribuído para a melhoria no crescimento das plantas (Figuras 8 e 9). Esse resultado foi discordante daquele observado por Wahid *et al.* (2007) com plantas de trigo provenientes de sementes pré-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e submetidas à salinidade que apresentaram significativa redução na razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

Nas folhas das plantas com 6 dias de idade, a salinidade aumentou igualmente os teores de Cl<sup>-</sup> nos dois tratamentos salinos (Figura 27A), cujos valores médios apresentaram-se 51% maiores que aqueles das plantas do tratamento controle/água. Aos 11 e 16 dias de idade, a salinidade aumentou os teores de Cl<sup>-</sup>, respectivamente, em 245 e 285%, não havendo interferência do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neste parâmetro. Nas raízes, os teores de Cl<sup>-</sup> (Figura 27B) também foram igualmente aumentados nas plantas dos tratamentos salinos. Comparando-se as médias dos tratamentos salinos com as médias dos controles, foram observados aumentos de 417, 423 e 340%, aos 6, 11 e 16 dias, respectivamente, não havendo interferência do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neste parâmetro. Comparando-se as médias dos tratamentos salinos, verificou-se que os teores de Cl<sup>-</sup> nas raízes foram 125% superiores àqueles visualizados nas folhas.





**Figura 27.** Teores de Cl<sup>-</sup> em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho sob condições controle (solução nutritiva), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (□) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▨), e sob condições salinas (solução nutritiva + NaCl a 80 mM), provenientes de sementes embebidas por 36 h em água (■) ou em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 mM (▩), aos 6, 11 e 16 dias de idade.

Da mesma forma que para o  $\text{Na}^+$  (Figura 24B), os teores de  $\text{Cl}^-$  nas raízes sofreram incrementos em consequência da salinidade nas plantas após os 6 dias de idade, mantendo-se praticamente constantes ao longo de todo o período experimental (Figura 27B), enquanto que nas folhas foram observados aumentos com o tempo de estresse. Comparando-se as médias dos teores de cloreto dos tratamentos salinos das plantas com 16 dias com aqueles aos 6 dias, observou-se um incremento de 85%. Aumentos nos teores de cloreto nas folhas e raízes de plantas submetidas à salinidade também foram observados por outros autores (COSTA *et al.*, 2003; AZEVEDO NETO *et al.*, 2004).

Wahid *et al.* (2007), trabalhando com plantas de trigo provenientes de sementes pré-tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e crescendo sob condições salinas, constataram diminuições nos teores de  $\text{Cl}^-$ , resultado diferente do aqui observado.

## 6. CONCLUSÕES

1. O peróxido de hidrogênio a 100 mM acelerou o processo de germinação das sementes de milho, podendo esse efeito estar relacionado ao grande aumento em atividade da peroxidase do ascorbato e, principalmente, da catalase, a qual se mostrou a principal enzima eliminadora dessa espécie reativa de oxigênio nas sementes;
2. O pré-tratamento de embebição das sementes de milho com peróxido de hidrogênio induziu aclimação das plantas ao estresse salino, revertendo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade no crescimento, podendo isso ser atribuído, pelo menos em parte, a uma maior eficiência do sistema enzimático antioxidativo estudado, resultante, principalmente, da ação da catalase, nas folhas, e da dismutase do superóxido nas raízes nos primeiros estádios de desenvolvimento das plântulas;
3. O pré-tratamento das sementes de milho com peróxido de hidrogênio não causou alterações nas trocas gasosas e nos teores dos solutos orgânicos que pudessem ser correlacionadas com o processo de aclimação das plantas ao estresse salino, embora tenha induzido uma melhor razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  nas raízes e, principalmente, nas folhas no maior tempo de exposição das plantas ao estresse, o que pode, pelo menos em parte, ter contribuído para o processo de aclimação à salinidade.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL,S.; SAIRAM, R. K., SRIVASTAVA, G. C., TYAGI, A.; MEENA, R. C. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. **Plant Science**, v. 169, p. 559-570, 2005.
- AGASTIAN, P., KINGSLEY, S.J., VIVEKANANDAN, M. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. **Photosynthetica**, v. 38, p. 287–290, 2000.
- ALI, G.; SRIVASTAVA, P. S.; IQBAL, M. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerants grow under NaCl stress. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 89-95, 1999.
- AMOR, N. B.; HAMED, K. B.; 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.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 146-150, 2002.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 235-241, 1992.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 50, p. 187-204, 1999.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Tradução de H.R. GHEYI, J.F. de MEDEIROS; F.A.V. DAMASCENO. Campina Grande: UFPB, 1991.
- AZEVEDO NETO, A.D; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Salinity and oxidative stress. (Eds.). **Abiotic Stress in plant Responses**, Aligarh: NAROSA Publishing House/Alpha Science International LTD, 2008. (*In press*).
- AZEVEDO-NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C. E. B.; GOMES-FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 87-94, 2006.

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; LACERDA, C. F.; SILVA, J. V.; COSTA, P. H. A.; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 31-38, 2004

AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; MEDEIROS, J.R.; GOMES FILHO, E. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 1114-1122, 2005.

AZEVEDO NETO, A.D.; TABOSA, J.N. Estresse salino em plântulas de milho: parte II Distribuição dos macronutrientes catiônicos e suas relações com sódio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, p.165-171, 2000.

BADAWI, G. H.; YAMAUCHI, Y.; SHIMADA, M.; SASAKI, R.; KAWANO, M.; TANAKA, K.; TANAKA, K. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. **Plant Science**, v. 166, p. 919-928, 2004.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v.14, p. 93-107, 2004.

BANNISTER, J. V.; BANNISTER, W. H.; ROTILIS, G. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 110-180, 1987.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BEAUCHAMP, C.; FRICOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BEWLEY, J.D. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1055-1066, 1997.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BIENERT, G.P.; SCHJOERRING, J.K.; JAHN, T.P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p. 994-1003, 2006.

BOLWELL, G.P.; BINDSCHEDLER, L.V.; BLEE, K.A.; BUTT, V.S.; DAVIES, D.R.; GARDNER, S.L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1367-1376, 2002.

BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, v. 164, p. 77-84, 2003.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 246-254, 1976.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**, Rockville: ASPP, 2000. p. 1158-1203.

BULL, L.T. Nutrição mineral do milho. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 63-145.

CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzymes in Germinating Wheat Seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, p. 127-132, 1993.

CARNEIRO, W. M. A.; SOBRINHO, J.N.; COELHO, M. C. S. G. **Grãos nos cerrados nordestinos: produção mercado e estruturação das principais cadeias**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2006. 88 p. (Série documentos do ETENE n° 8).

CHING, T.M. Activation of germination in douglas fir seed by hydrogen peroxide. **Plant Physiology**, v. 34, p.557-563, 1959.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J.-K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science Society of America**, v. 45, p. 437-448, 2005.

COSTA, P.H.A.; SILVA, J.F.; BEZERRA, M.A.; ENÉAS FILHO, J. PRSCO, J.T.; GOME-FILHO, E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 289-297, 2003.

DAKER, A. **A água na agricultura: manual de hidráulica agrícola**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1976.

DAVIS, B.J. Disk eletrophoresis-II: Method and applications to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 404-427, 1964.

DEMIRAL, T.; TÜRKAN, 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.

DESIKAN, R.; HANCOCK J.T.; NEILL, S.J. Oxidative stress signaling. **Top Current Genetics**, v. 4, p. 129-149, 2003.

DUARTE, J.O. Introdução e importância econômica do milho. In: CRUZ, J.C.; VERSIANI, R.P.; FERREIRA, M.T.R. (Ed.) **Cultivo do Milho**. 2000. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>>. Acesso em: 06 de março de 2007.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EL-BAKI, A.; HANNA, H.; MOHAMED, A.A.; HUSSEIN, M.M. Influence of salinity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and eletrophoretic patterns of protein and isoenzymes in leaves of some onion cultivars. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 2, p. 1220-1227, 2003.

ERDEI, L.; TALEISNIK, E. Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 381-387, 1993.

FAGERIA, N. K.; GHEYI, H.R. **Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares**. In: GHEYI, H. R., QUEIROZ, J. E., MEDEIROS, J. F. (Eds). Simpósio " Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada".Campina Grande: UFPB, p. 383, 1997.

FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. 2000. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>. Acesso em 10 de novembro de 2006.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 247-245. 2003.

FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 307-319, 2004.

GAINES, T. P.; PARKER, M. B.; GASCHO, G. J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 371-374, 1984.

GAPPER, C.; DOLAN, L. Control of plant development by reactive oxygen species. **Plant Physiology**, v.141, p. 341-345, 2006.

GHEYI, H.R. Problema de salinidade na agricultura irrigada. In: OLIVEIRA, T.S.; ASSIS JÚNIOR, R.N.; ROMERO, R.E.; SILVA, J.R.C. (Eds.). **Agricultura, Sustentabilidade e o Semi-árido**. Fortaleza:DCS/UFC, p. 329-346, 2000.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILBERT, G. A.; GADUSH, M. V.; WILSON, C.; MADORE, M. A. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v.49, n.318, p.107-114. 1998.

GONG, M.; CHEN, B.; ZHONG-GUANG, L.; GUO, L. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1125-1130, 2001.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.

HAVIR, E.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalases in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.

HAWLLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HAWLLIEWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1985.

HENZLER T, STEUDEL, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 2053-2066, 2000.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-cultured method for growing plants without soil**. California: California Agricultural Experiment Station, Circular n° 37, 32p. 1950.

HONG, Z.; LAKKNENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D.P.S. Removal of feedback inhibition of delta 1-pyrroline-5- carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1129-1136, 2000.

HSU, S.Y.; HSU, Y. T.; KAO, C. H.; The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 73-78, 2003.

HURKMAN, W. J.; FORNARI, C. S.; TANAKA, C. K. A comparison of the effect of salt on polypeptide and translatable mRNA in roots of a salt tolerant and salt-sensitive cultivar of barley. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1444-1456, 1989.

KANG, H. –M.; SALTVEIT, M. E. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 548-556, 2001.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.

KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, v. 40, p. 482-487, 2000.

LACERDA, C.F. **Crescimento e acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos em dois genótipos de sorgo forrageiro submetidos a estresse salino**. 2000. 163 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A.; RUIZ, H.A. Changes in growth and in solute concentration in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, p. 69-76, 2005.



LACERDA, C. F.; OLIVEIRA, H. P. M.; OLIVEIRA, T. S.; GOMES-FILHO, E. Crescimento e acúmulo de íons em folhas de sorgo forrageiro submetido a soluções iso-osmóticas de sais (NaCl + KCl). **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, p. 1-6, 2003.

LEE, D. H.; KIM, Y. S.; LEE, C. B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oriza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 737-745, 2001.

LEE, S.C, KANG, B. C.; OH, S. E.; Induction of ascorbate peroxidase by ethylene and hydrogen peroxide during growth of cultured soybean cells. **Molecular Cells**, v. 9, p. 166-171, 1999.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stresses**. 2nd ed. New York: Academic Press, v. 2, 1980.

LIRA, M.A.; FARIS, M.A.; MAFRA, R.C. Soil fertility and fertilizer use research in intercropping systems in Northeast Brazil. **Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin**, v. 5, p. 151-156, 1982.

LIRIC-RAJLIC, T.D.I; MITROVIC, A; RADOTIC, K. Activities of antioxidant systems during germination of *Chenopodium rubrum* seeds. **Biologia Plantarum** v.47, p. 527-533, 2003.

LOGGINI, B.; SCACARTZZA, E.; BRUGNOLI, F.; NAVARRI-IZZO, F. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subject to drought. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1091-1100, 1999.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba, SP: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1989.

MANSOUR, M. M. F. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 36, p. 767-772, 1998.

MANSOUR, M. M. F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 491-500, 2000.

MASS, E.V. Testing crops for salinity tolerance. In: MARANVILLE, J.W.; BALIJAR, B.V.; DUNCAN, R.R.; YOHE, J.M. (Eds.) **Proceeding workshop on adaptation of plant to soil stress**, Linco In: INTSORMIL, p. 234-247, 1993.

McKERSIE, B.D.; LESHEM, Y.Y. **Stress and stress coping and cultivated plants**. 1<sup>a</sup> ed., Dordrecht: Kluwer Academic Publishes, 1994.

MELONI D.A.; OLIVA M.A.; MARTINEZ C.A.; CAMBRAIA J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.49, p. 69-76, 2003.

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

MITTOVA, V.; TAL, M.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 393-400, 2002.

- MØLLER, M.I.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-81, 2007.
- M'RAH, S.; OUERGHI, BERTHOMIEU, C.; HAVAUX, M.; JUNGAS, C.; HAJJI, M.; GRIGNON, C.; LACHAAIL, M. Effects of NaCl on the growth, ion accumulation and photosynthetic parameters of *halimolobos halophila*. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.1022-1031, 2006.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance. **New Phytologist**, v. 167, p. 645-663, 2005.
- MYLONA, P.V.; POLIDOROS, A.N.; SCANDALIOS, J.G. Antioxidant gene responses to ROS-generating xenobiotics in developing and germinated scutella of maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1301-1312, 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.
- NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 388-395, 2002.
- NEUMANN, P. Salinity resistance and plant growth revisited. **Plant, Cell and Environment**, v.20, p. 1193-1198, 1997.
- NIU, X.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, v. 109, p. 735-742, 1995.
- NOBLE, C.L.; ROGERS, M.E. Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. **Plant Soil**, v. 146, p. 99-107, 1992.
- 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.
- OGAWA, K.; IWABUCHI, M. A Mechanism for Promoting the Germination of *Zinnia elegans* Seeds by Hydrogen Peroxide. **Plant Cell Physiology**. v. 42, p. 286-291, 2001.
- OLIVEIRA, M. **Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais**. In: Simpósio "Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura Irrigada". Campina Grande: UFPB, p. 3-35, 1997.
- PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos dos Grãos do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Circular Técnica n.º 75).
- PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees-Structure and Function**, v. 18, p.167–174, 2004a.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B.; MOHANTY, P. Defense potentials to NaCl in mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 531-542, 2004b.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling: computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, v. 126, p. 445-462, 2001.

PRASAD, T.K.; ANDERSON, M.D.; MARTIN, B.A.; STEWART, C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **The Plant Cell**, v. 6, p. 65-74, 1994.

RICHARDS, L. A. **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. US Salinity Laboratory Staff. US Dept. Agric. Handbook n° 60. USA. 1954.

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.

SARATH, G.; MITCHELL, R.; HOU, G.; BAIRD, L.M. Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C<sub>4</sub>-grasses. **Planta**, v. 226, p. 697-708, 2007.

SCANDALIOS, J. G. The rise of ROS. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, p. 483-486, 2002.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1591-1602, 2001.

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

SILVA, J.V. **Efeitos do CaCl<sub>2</sub> no crescimento e acumulação de osmorreguladores em plantas de feijão-de-corda cv. Pitiúba estressadas com NaCl**. 1998. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SINGH, A.K.; DUBEY, R.S. Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystems I and II in rice seedlings induced by NaCl. **Photosynthetica**, v. 31, p. 489-499, 1995.

SINGH, B. B.; BRACKEN, C. A.; HASEGAWA, P. M.; HANDA, A. K.; BUCKEL, S.; HERMODSON, M. A.; PFANKOCH, F.; RGINIER, F. E.; BRESSAN, R. A. Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adjustment in plant cells. **Plant Physiology**, v. 85, p. 529-536, 1987.

ŚLESIAK, 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.

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 214-219, 1998.

SRB (Sociedade Rural Brasileira) **Agricultura – generalidades criar e plantar – texto milho**. 2001. Disponível em: < <http://criareplantar.com.br/agricultura/milho/milho.php> > acesso em: 10 de dezembro de 2007.

SREENIVASULU, N.; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PRAKASH, H. S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITRI, H. S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with different salt tolerance. **Plant Science**, v. 141, p. 1-9, 1999.

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

THOMPSON, J.E.; LEDGE, R.L.; BARBER, R.F. The role of free radicals in senescence and wounding. **New Phytologist**, v. 105, p. 317-344, 1987.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; DE PINTO, M.C.; DE GARA, L. A. Comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1647-1654, 2001.

UCHIDA, A.; JAGENDORF, A.T.; HIBINO, T.; TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, v. 163, p. 515-523, 2002.

VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARTY, R.; THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) — differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v. 165, p. 1411-1418, 2003.

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

VEERANAGAMALLAIAH, G.; CHANDRAOBULREDDY, P.; JYOTHSNAKUMARI, G.; SUDHAKAR, C. Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase activity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italica* L.) with differential salt sensitivity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 239-244, 2007.

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

WAHID, A.; PERVEEN, M.; GELANI, S.; BASRA, S.M.A. Pretreatment of seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 283-294, 2007.

WANG, Y.; NIL, N. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.75, p.623-627, 2000.

WANG, Y.; YING, Y.; CHEN, J.; WANG, X. Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. **Plant Science**, v. 167, p. 671-677, 2004.

WILLEKENS, H., CHAMNONGPOL, S., DAVEY, M., SCHRAUDNER, M., LANGEBAEELS, C., VAN MONTAGU, M. INZÉ, D., VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. **The EMBO Journal**, v.16, p. 4806-4816, 1997.

WOJTYLA, L.; GARNCZARSKA, M.; ZALEWSKI, T.; BEDNARSKI, W.; RATAJCZAK, L.; JURGA, S. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p.1207-1220, 2006.

WOODBURY, W.; SPENCER, A.K.; STAHMANN, M.A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 301-305, 1971.

XIONG, L. & ZHU, J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, the Cell and Environment**, v. 25, p.131-139, 2002.

YAMADA, T., TAKATSU, Y.; MANABE, T.; KASUMI, M.; MARUBASHI, W. Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of gladiolus. **Plant Science**, v. 164, p. 213-221, 2003.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino acids with ninhydrin. **The Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YE, X.; PAN, S. Q.; KUC, J. Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance to tobacco to blue mold (*Peronospora tobaciana*) and to tobacco mosaic virus. **Phytopatology**, v. 80, p. 1295-1299, 1990.

ZHANG, H.-X.; BLUMWALD, E. Transgenic salt-tolerance tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 765-768, 2001.

ZHU, J.-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 66-71, 2001.