

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

FRANKLIN ARAGÃO GONDIM

**PRÉ-TRATAMENTO FOLIAR COM H₂O₂ COMO ESTRATÉGIA
PARA MINIMIZAR OS EFEITOS DELETÉRIOS DA SALINIDADE EM
PLANTAS DE MILHO**

FORTALEZA – CEARÁ

- 2012 -

FRANKLIN ARAGÃO GONDIM

**PRÉ-TRATAMENTO FOLIAR COM H₂O₂ COMO ESTRATÉGIA PARA
MINIMIZAR OS EFEITOS DELETÉRIOS DA SALINIDADE EM
PLANTAS DE MILHO**

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

**ORIENTADOR:
ENÉAS GOMES FILHO**

**FORTALEZA – CEARÁ
- 2012 -**

Esta Tese de doutorado foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor 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

TESE APROVADA EM: 19/09/ 2012

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará



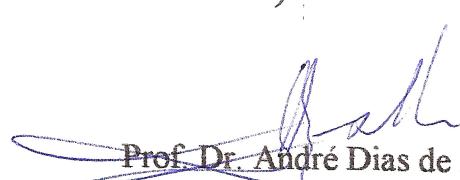
Prof. Dr. José Helio Costa (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. José Tarquinio Prisco

Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Dr. Marlos Alves Bezerra

Embrapa Agroindústria Tropical

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

G635p Gondim, Franklin Aragão.
Pré-tratamento foliar com H₂O₂ como estratégia para minimizar os efeitos deletérios da salinidade em plantas de milho / Franklin Aragão Gondim – 2012.
147 f.: il., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
Coorientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.

1. Enzimas antioxidativas 2. Estresse salino 3. Soltos orgânicos e inorgânicos I. Título.

CDD 574-192

Dedico,

Ao meu Pai, Sérgio Roberto Porto Gondim (*In memoriam*),

à minha mãe, Maria Aurini Aragão Gondim,

à minha esposa, Janaina Gondim,

ao meu irmão André Gondim e sua linda família,

Com muito amor!

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa a mim concedida no início do curso, bem como pelo auxílio financeiro às pesquisas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal).

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

Ao professor Dr. José Helio Costa pela excelente co-orientação, amizade, tempo e auxílio na execução de um dos artigos.

Aos componentes da banca, os professores Dr. José Tarquinio Prisco, Dr. André Dias de Azevedo Neto e ao pesquisador, Dr. Marlos Alves Bezerra, pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

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

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia (IFCE), campus Quixadá e campus Maracanaú que me deram todo o apoio necessário para que eu pudesse trabalhar e cursar o doutorado. Agradecimento todo especial à professora Ana Angélica (Coordenadora do curso de Química de Quixadá), ao professor Assis Rocha (Diretor de ensino de Quixadá) e à professora Rossana Barros (coordenadora do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária de Maracanaú). Agradeço também o convívio e a amizade com os demais professores e técnicos, principalmente aos amigos Luciano Marinho, Antônio Carlos Júnior e Isaac Ricarte.

Ao meu pai, Sérgio Roberto Porto Gondim (*In memoriam*), que, com certeza, me deu forças lá de cima e foi a inspiração maior para a realização deste trabalho.

À minha mãe, Maria Auriní Aragão Gondim, pelo esforço, educação, incentivo, companheirismo, sabedoria e compreensão.

À Janaina Chávez, pelo amor, companheirismo e compreensão.

Aos meus avós que sempre se fizeram presentes, Leonília Aragão, Helena e Ferdinand Gondim (*In memorian*).

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

Aos meus sobrinhos, Artur e Pedro Gondim, e a minha cunhada Laryssa Gondim, pelos momentos de alegria e descontração necessários para a renovação das energias.

Ao amigo Elton Marques, como sempre muito prestativo e competente, pelo auxílio na elaboração dos gráficos e na redação do primeiro artigo.

À Nara Lídia, pela amizade e pela ajuda na redação do segundo artigo.

Aos demais componentes do grupo de Fisiologia Vegetal: Prof. Dr. José Tarquínio Prisco, Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho, Aiala Amorim, Alexandre Bosco, Alexcyane Feijão, Ana Raquel, Carlos Eduardo, Celso Marinones, Cibele Gadelha, Elaine Angelim, Elton Marques, Gyedre Araújo, Juan Carlos, Jones Vidal, Lineker Lopes, Luckas Huriel, Michella Albuquerque, Nara Lídia, Paulo André, Rafael Miranda, Thalita Montoril, Thiago Augusto, Valdinéia Soares, Víctor Castro, Viviane Ruppenthal e Viviane Pinho pela ajuda, amizade e convivência.

A todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na conquista desse objetivo.

RESUMO

GONDIM, F. A. Pré-tratamento foliar com H₂O₂ como estratégia para minimizar os efeitos deletérios da salinidade em plantas de milho. Orientador: Enéas Gomes Filho. Fortaleza: UFC. 147f. (Tese). 2012.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do pré-tratamento de pulverização foliar das plantas de milho com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sobre a aclimatação ao estresse salino, estudando os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos. A presente tese foi dividida em três experimentos independentes que resultaram na produção de três capítulos, cada um correspondendo a um artigo científico. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob condições hidropônicas, utilizando o híbrido triplo de milho (*Zea mays* L), BRS 3003. Oito dias após a semeadura, as plântulas foram pulverizadas com água destilada (controle) ou solução aquosa de H₂O₂ na concentração de 10 mM e, 48 h após o início da pulverização, foram submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM. No primeiro trabalho, foram estudados os efeitos da aplicação foliar de H₂O₂ no crescimento e nos teores de solutos orgânicos e inorgânicos de plantas de milho crescendo sob condições salinas. Verificou-se que o pré-tratamento de pulverização das plantas de milho com H₂O₂ induziu aclimatação das plantas de milho ao estresse salino, revertendo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade no crescimento. Este efeito foi atribuído, pelo menos em parte, a um maior acúmulo de proteínas solúveis, carboidratos solúveis e NO₃⁻, bem como a um menor acúmulo de íons tóxicos (Na⁺ e Cl⁻) nas folhas. O segundo trabalho avaliou os efeitos da aplicação foliar de H₂O₂ no crescimento, na atividade das enzimas antioxidativas, na peroxidação dos lipídios (teores de malondialdeído-MDA) e na expressão da enzima catalase (CAT) em plantas de milho sob condições de estresse salino. Constatou-se que a salinidade reduziu o crescimento das plantas e que a aplicação foliar de H₂O₂ minimizou este efeito. Observou-se também que as enzimas antioxidativas estudadas (catalase, peroxidase do guaiacol, peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido) tiveram suas atividades aumentadas pela aplicação foliar de H₂O₂. A CAT se mostrou a principal enzima responsiva ao H₂O₂ e seu aumento de atividade parece estar relacionado à regulação da expressão gênica. Sob condições salinas, a menor peroxidação de lipídios foi encontrada nas plantas que apresentaram maiores atividades da CAT. De modo geral, concluiu-se que a pulverização foliar das plantas de milho com H₂O₂ foi capaz de reduzir os efeitos deletérios da salinidade no crescimento das plantas e na

peroxidação dos lipídios. Essas respostas podem ser atribuídas, pelo menos em parte, à capacidade do H₂O₂ de induzir aumento na atividade e/ou expressão das enzimas antioxidativas, especialmente a CAT. O terceiro trabalho analisou os efeitos da aplicação foliar de H₂O₂ na área foliar, nos teores relativos de clorofila, nos teores relativos de água, nas trocas gasosas e nos teores de H₂O₂, ascorbato e glutationa de plantas de milho crescendo sob condições salinas. De modo geral, a salinidade reduziu a área foliar, os teores relativos de clorofila e os teores relativos de água e a pulverização foliar com H₂O₂ foi eficaz em minimizar esse efeito. A salinidade reduziu os parâmetros fotossintéticos (condutância estomática, transpiração, fotossíntese e concentração interna de CO₂) e o pré-tratamento de pulverização das plantas com H₂O₂ foi capaz de reverter parcialmente esse efeito. Os teores de H₂O₂ foram aumentados pela salinidade tanto nas folhas como nas raízes e a pulverização foliar com H₂O₂ mostrou-se eficiente em reduzir este efeito, sem, contudo, alterar o estado redox dos antioxidantes analisados (ascorbato e glutationa).

Palavras-chave: Ascorbato, enzimas antioxidativas, estresse salino, glutationa, pulverização foliar com H₂O₂, solutos orgânicos e inorgânicos, trocas gasosas, *Zea mays*.

ABSTRACT

GONDIM, F. A. H₂O₂ leaf spray pretreatment alleviates the deleterious effects of salinity on maize plants. UFC. Advisor. Enéas Gomes Filho. Fortaleza: UFC. 147p. (D.Sc. Thesis). 2012

This study evaluated the effects of H₂O₂ leaf spraying pretreatment on the maize plant acclimation to salt stress, studying the physiological and biochemical mechanisms involved. The present thesis was divided into three independent experiments that resulted in three chapters, each one corresponding to a scientific article. The experiments were conducted under hydroponic conditions and maintained in greenhouse, the plant model used was triple hybrid of maize (*Zea mays* L.), BRS 3003. Eight days after sowing (DAS), the seedlings were sprayed with 10 mM H₂O₂ solution or distilled water (as a control). Forty-eight hours after the spraying beginning, the seedlings were subjected to treatment with NaCl at 80 mM. In the first study, we analyzed the effects of H₂O₂ leaf spraying pretreatment on the growth and on the levels of organic and inorganic solutes in maize plants under salt stress. It was observed that H₂O₂ leaf spraying pretreatment promoted plant acclimation to salt stress, reducing the deleterious effects of salinity on the maize growth. This effect can be attributed, at least partially, to a great production of proteins, and soluble carbohydrates and NO₃⁻ as well as lower levels of Cl⁻ and Na⁺ in leaves. The second study evaluated the effects of H₂O₂ leaf spraying pretreatment on growth, antioxidative enzymes activity, lipid peroxidation (levels of malondialdehyde - MDA) and on the catalase expression (CAT) in maize plants under salt stress. It was observed that salinity reduced maize seedling growth when compared to control conditions, and H₂O₂ foliar spraying was effective in minimizing this effect. Analysis of the antioxidative enzymes (catalase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase) revealed that H₂O₂ leaf spraying increased antioxidant enzyme activities. CAT was the most responsive of these enzymes to H₂O₂, with higher activity since the beginning of the treatment (48 h), while guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase were responsive only at later stages (240 h) of treatment. Increased CAT activity appears linked to gene expression regulation. Lower MDA levels were detected in plants with higher CAT activity, which may result from the protective function of this enzyme. Overall, we can conclude that pretreatment with H₂O₂ leaf spraying was able to reduce the deleterious salinity effects on seedling growth and lipid peroxidation. These responses could be attributed to the H₂O₂

ability to induce antioxidant defenses, especially CAT activity. The third study evaluated the effects of H₂O₂ leaf spraying pretreatment on leaf area, relative chlorophyll content, relative water content, gas exchange and on the H₂O₂, ascorbate and glutathione contents in salt-stressed maize plants. In general, the salinity reduced leaf area, relative chlorophyll content and relative water content of the maize plants in comparison to the plants that grew under control conditions, moreover H₂O₂ leaf spraying was effective in minimize this effect. The salt treatment reduced photosynthetic parameters and, the H₂O₂ leaf spray was able to partially reverse this effect. The H₂O₂ content was increased by salinity in both, leaves and roots, and H₂O₂ leaf spray was effective in reducing this negative effect. The H₂O₂ foliar application did not alter the redox state of the antioxidants studied (ascorbate and glutathione).

Keywords: Antioxidative enzymes, ascorbate, gas exchange, glutathione, H₂O₂ leaf spray, salt stress, organic and inorganic solutes, *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Principais sítios de produção de ROS em células vegetais.....	27
Figura 2. Via de redução monovalente do O_2 à H_2O_2	29
Figura 3. Ciclo do ascorbato-glutationa.....	34
Figura 4. Sequência de mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem quando as plantas são submetidas ao estresse salino.....	46

CAPÍTULO I

Figura 1. Matéria seca da parte aérea, das raízes e total de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM).....	76
Figura 2. Área foliar e razão de área foliar de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM). Os dados referem-se à coleta realizada após 240 h do início da pulverização.....	77
Figura 3. Teores de proteínas solúveis, carboidratos solúveis, prolina e N-aminossolúveis em folhas de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM).....	79
Figura 4. Teores de Na^+ , Cl^- , K^+ e NO_3^- em folhas de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM).....	81

CAPÍTULO II

Figura 1. Shoot and root dry masses of maize plants at 0 (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying. The plants were submitted to four treatments: 1. sprayed with distilled water and not salt-stressed (water/control), 2. sprayed with H_2O_2 solution and not salt-stressed (H_2O_2 /control), 3. sprayed with distilled water and salt-stressed (water/salt-stressed), and 4. sprayed with H_2O_2 solution and salt-stressed (H_2O_2 /salt-stressed). The leaf spraying was carried out after the first harvest (0 h) and repeated after 24 h. Salt was added at 48 and 72 hours after spraying (HAS)..... 92

Figura 2. Maize plants under different treatments at 240 hours after leaf spraying: water/control plants; H_2O_2 /control plants; water/salt-stressed plants; and H_2O_2 /salt-stressed plants..... 93

Figura 3. CAT activities determined by spectrophotometric and polyacrylamide gel analyses in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying..... 95

Figura 4. GPX activities determined by spectrophotometric and polyacrylamide gel analyses in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying..... 96

Figura 5. APX activities determined by spectrophotometric and polyacrylamide gel analyses in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying..... 98

Figura 6. SOD activities determined by spectrophotometric and polyacrylamide gel analyses in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying..... 99

Figura 7. MDA content in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying under the following treatments: water/control, H₂O₂/control, water/salt-stressed and H₂O₂/salt-stressed..... 101

Figura 8. Transcript levels of CAT in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 12, 24, 36, 48, 60, 96 and 240 hours after leaf spraying under control and salinity conditions. RT-PCR products of CAT and EF1 α on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Normalization of the quantity of CAT transcripts through a ratio of integrated densities of the CAT cDNA and EF1 α elongation factor cDNA bands..... 102

CAPÍTULO III

Figura 1. Área foliar, teores de clorofila e teores relativos de água de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM), aos 7 e 14 dias da última adição de sal.... 123

Figura 2. Taxa de Fotossíntese líquida, condutância estomática, taxa de transpiração e concentração interna de CO₂ de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM), aos 7 e 14 dias da última adição de sal..... 126

Figura 3. Teores de H₂O₂ nas folhas e nas raízes de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM), aos 7 e 14 dias da última adição de sal..... 129

Figura 4. Teores de ascorbato reduzido nas folhas e nas raízes, teores de ascorbato total nas folhas e nas raízes e estado redox do ascorbato nas folhas e nas raízes de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM), aos 7 e 14 dias da última adição de sal..... 131

Figura 5. Teores de glutationa reduzida nas folhas e nas raízes, teores de glutationa total nas folhas e nas raízes e estado redox da glutationa nas folhas e nas raízes de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM), aos 7 e 14 dias da última adição de sal..... 134

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Valores do teste <i>F</i> para matéria seca da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST), área foliar (AF) e razão de área foliar (RAF) de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H ₂ O ₂ (10 mM).....	75
Tabela 2. Valores do teste <i>F</i> para os teores de proteínas solúveis, carboidratos solúveis, prolina e N-aminossolúveis em folhas de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H ₂ O ₂ (10 mM).....	78
Tabela 3. Valores do teste <i>F</i> para os teores de Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺ e NO ₃ ⁻ em folhas de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H ₂ O ₂ (10 mM).....	81

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

APX: Peroxidase do ascorbato

AsA: Ascorbato reduzido

CAT: Catalase

CEa: Condutividade elétrica da água de irrigação

CEes: Condutividade elétrica do extrato de saturação

DHA: Ascorbato oxidado ou desidroascorbato

DHAR: Redutase do desidroascorbato

DTNB: 5,5 ditio-bis 2 ácido-nitrobenzóico

DTT: Ditiotreitol

GPX: Peroxidase do guaiacol

GR: Redutase da glutationa

GSH: Glutationa reduzida

GSSG: Glutationa oxidada

MDA: Malondialdeído

MDHAR: Redutase do monodesidroascorbato

PST: Percentagem de sódio trocável

ROS: Do inglês, *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigênio)

RT-PCR: Transcriptase reversa - Reação em cadeia da polimerase

SOD: Dismutase do superóxido

Aclimatação: Mudanças fisiológicas, bioquímicas e morfológicas temporárias que ocorrem em um organismo e aumentam sua tolerância às variações do ambiente externo. Resposta homeostática que não se transmite às gerações futuras.

Adaptação: Capacidade desenvolvida por um organismo, através da seleção natural ou artificial, de tolerar ambientes estressantes, devido às mudanças fisiológicas, bioquímicas e morfológicas permanentes. Essas mudanças são transmitidas às gerações futuras.

Antioxidante: Qualquer substância que, mesmo presente em baixas concentrações em relação ao seu substrato oxidável, diminui significativamente ou evita sua oxidação.

Apoplasto: Em células vegetais, constitui uma rede de espaços extracelulares que faz as conexões entre as células vizinhas.

Apoptose: Conhecida como morte celular programada. Este processo ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução. Está relacionada com a manutenção da homeostase e pode também ser induzida por um estímulo ambiental ou patológico.

Aquaporinas: Proteínas integrais da membrana plasmática conhecidas como canais transportadores de água, estas permitem a entrada ou saída de água das células.

Enzimas Antioxidativas: Grupo de enzimas responsáveis pela eliminação das principais ROS como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical superóxido ($\cdot O_2^-$). Dentre as enzimas destacam-se: a SOD, a CAT, a GPX, a APX bem como outras enzimas do ciclo do ascorbato-glutatona (MDHAR, DHAR, e GR).

Espécies Reativas de Oxigênio: Espécies produzidas no metabolismo aeróbico normal, durante o fluxo de elétrons na mitocôndria e no cloroplasto, quando os transportadores de elétrons reduzidos reagem parcialmente com o O_2 na ausência de outros aceptores de elétrons. Em células vegetais, as ROS também podem ser produzidas nos peroxissomos, no citosol, na membrana plasmática e no apoplasto. As ROS mais comumente encontradas são o H_2O_2 e os radicais $\cdot O_2^-$ e hidroxil ($\cdot OH$).

Estado Redox: Razão entre os valores apresentados por uma substância em seu estado reduzido e seu valor total (Estado reduzido + Estado oxidado), podendo ser expresso em percentagem. Pode ser calculado pela expressão: $[(\text{Estado reduzido}) / (\text{Estado reduzido} + \text{Estado oxidado}) \times 100]$.

Estresse ambiental: Qualquer componente do meio ambiente que seja capaz de alterar o funcionamento normal de um organismo que está crescendo nesse ambiente.

Estresse oxidativo: Quando o fator de estresse é uma ROS, proveniente das reações metabólicas que reduzem parcialmente o oxigênio molecular.

Estresse salino: Quando o fator de estresse é o excesso de sais solúveis. São considerados salinos os solos que possuem $CE_{ES} \geq 4,0 \text{ dS m}^{-1}$, $PST < 15\%$ e $pH < 8,5$.

Sodicidade: Solos que apresentam $CE_{ES} \leq 4,0 \text{ dS m}^{-1}$, $PST > 15\%$ e $pH > 8,5$.

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	08
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	14
DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS.....	15
SUMÁRIO.....	17
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Justificativa	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Solos salinos.....	23
2.2. Efeitos da salinidade sobre o crescimento das plantas.....	24
2.3. As espécies reativas de oxigênio e o metabolismo.....	26
2.4. As enzimas do sistema antioxidativo.....	30
2.5. O sistema antioxidativo não-enzimático.....	35
2.6. Ajustamento osmótico.....	37
2.7. Salinidade e fotossíntese.....	39
2.8. Tolerância das plantas à salinidade.....	41
2.9. O peróxido de hidrogênio como uma molécula sinalizadora.....	43
2.10. Aclimatação ao estresse salino.....	45
2.11. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.....	46
2.12. A cultura do milho.....	48
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
4. OBJETIVOS.....	66
4.1. Gerais.....	66
4.2. Específicos.....	66

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL..... 67

CAPÍTULO I (Efeitos do H₂O₂ no crescimento e acúmulo de solutos em plantas de milho sob estresse salino).....	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	70
INTRODUÇÃO.....	70
MATERIAL E MÉTODOS.....	72
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÃO.....	83
AGRADECIMENTOS.....	83
REFERÊNCIAS.....	84

CAPÍTULO II (Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize).....	87
ABSTRACT.....	89
INTRODUCTION.....	90
RESULTS.....	91
Effect of H ₂ O ₂ leaf spraying on plant growth under salt stress.....	91
Antioxidative enzyme activities and their isoenzymes.....	94
Effect of H ₂ O ₂ leaf spraying on malondialdehyde content.....	100
Effect of H ₂ O ₂ leaf spraying on the CAT transcript level.....	100
DISCUSSION.....	100
MATERIAL AND METHODS.....	105
Plant material and experimental conditions.....	105
Harvests and growth measurements.....	106
Extract preparation for enzyme assays, isoenzyme analysis and lipid peroxidation.....	107
Enzyme assays.....	107
Isoenzyme assays.....	107
Lipid peroxidation.....	108

Total RNA extraction and RT-PCR.....	109
ACKNOWLEDGMENTS	109
REFERENCES.....	110
CAPÍTULO III (Efeitos da pulverização de H₂O₂ na área foliar, nas trocas gasosas e nos teores de H₂O₂, ascorbato e glutationa em plantas de milho sob estresse salino).....	114
RESUMO.....	115
ABSTRACT.....	116
INTRODUÇÃO.....	116
MATERIAL E MÉTODOS.....	118
Material vegetal, condições experimentais e tratamentos.....	118
Coleta do material e determinação da área foliar.....	119
Determinação dos teores relativos de água.....	119
Trocas gasosas e teores relativos de clorofila.....	120
Determinação dos teores de H ₂ O ₂	120
Determinação dos teores de Ascorbato.....	121
Determinação dos teores de Gluatação.....	121
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
Área foliar, teores de clorofila e teores relativos de água.....	122
Taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática, taxa de transpiração e concentração interna de CO ₂	125
Teores de H ₂ O ₂ nas folhas e raízes.....	128
Teores de Ascorbato reduzido e estado redox do ascorbato nas folhas e raízes.....	130
Teores de Glutatação reduzida e estado redox da glutatação nas folhas e raízes.....	133
CONCLUSÃO.....	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	142
ANEXOS.....	145

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 tanto nas áreas irrigadas como nas não irrigadas. Sendo assim, a salinidade se destaca como um dos principais desafios ambientais enfrentados pela agricultura (PELEG *et al.*, 2011).

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 da retirada da vegetação associada ao uso de águas salinas na irrigação (MUNNS, 2005). Para Fageria *et al.* (2010), em escala global, as áreas afetadas pela salinidade têm aumentado, especialmente, pela prática da irrigação sem o manejo adequado da água e do solo.

A maior parte dos solos afetados pela salinidade encontra-se em países em desenvolvimento, onde a densidade populacional e a necessidade por alimentos são elevadas (FAGERIA *et al.*, 2010). Além da salinidade, a agricultura mundial e a produção de alimentos têm enfrentado problemas devido à diminuição da disponibilidade de terras agricultáveis (urbanização) e da redução da disponibilidade de água associadas às mudanças climáticas (MITTLER; BLUMWALD, 2010). Estima-se que seja necessário um aumento de cerca de 50% na produtividade das culturas de arroz, trigo e milho para atender as necessidades alimentares da população em 2050 (GODFRAY *et al.*, 2010). Assim, aumentar a produção, o rendimento e a estabilidade das culturas em áreas sujeitas à salinidade mostra-se necessário para atender ao crescente aumento da população mundial (PELEG *et al.*, 2011). Portanto, a incorporação de áreas afetadas por sais no processo produtivo de alimentos, em um futuro

próximo, exercerá papel fundamental do ponto de vista socioeconômico (FAGERIA *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos indicam que, além de recuperar o solo, o uso de cultivares tolerantes à salinidade pode ser uma ação complementar para a produção de alimentos em solos salinos (KHADRI *et al.*, 2007; GAMA *et al.*, 2009). 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 a aclimatação das plantas ao estresse (NOBLE; ROGERS, 1992). Embora a biologia vegetal nos últimos anos esteja enfrentando enorme progresso proporcionado pelo surgimento de ferramentas analíticas modernas, o que pode ser verificado pela grande quantidade de pesquisa publicada na área de fisiologia vegetal, a compreensão dos mecanismos que conferem tolerância à salinidade numa espécie vegetal ainda é limitada (SILVEIRA *et al.*, 2010).

O processo de aclimatação a determinadas condições de estresse se constitui numa alternativa para aumentar a capacidade das plantas de sobreviverem a condições adversas. A aclimatação 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 aclimatação induziu uma tolerância cruzada (NEIL *et al.*, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004). Nesse processo, 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

aclimatação 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 aclimatação das plantas à salinidade. Contudo, não há informações se o pré-tratamento por pulverização foliar de H_2O_2 também é capaz de induzir aclimatação 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, apresentando, 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 pré-tratadas com H_2O_2 por pulverização foliar 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 sais solúveis encontrados são os cloretos, sulfatos e bicarbonatos de Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} . Porém, também são encontrados, com menor frequência os cátions K^+ e NH_4^+ e os ânions NO_3^- e CO_3^{2-} (RIBEIRO, 2010). 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).

Os solos salinos geralmente se localizam em áreas baixas, para onde convergem os sais das áreas circunvizinhas. Nesses locais, a salinização pode estar relacionada às condições que restringem a drenagem do solo, como a presença de lençol freático alto ou a baixa permeabilidade do solo. Estes fenômenos impedem a lavagem dos sais presentes na superfície. Além disso, em regiões com climas áridos e semiáridos, a salinização dos solos é

intensificada devido à elevada evapotranspiração, evento que favorece a ascenção capilar dos sais para a superfície do solo (RIBEIRO, 2010). 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.

No Brasil, o problema da salinidade 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). Conforme Ribeiro *et al.* (2003), os solos afetados por sais ocupam cerca de 160.000 km² (16 milhões de hectares) ou 2% do território do Brasil. A maior parte desses solos encontra-se no estado da Bahia (44%) e do Ceará (25,5%). No Brasil, além da região Nordeste, são encontrados solos salinos no Rio Grande do Sul e no pantanal mato-grossense (RIBEIRO *et al.*, 2009).

2.2. Efeitos da salinidade sobre o crescimento das plantas

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 (Fase 1), e/ou ao excesso de íons absorvidos pela planta, causando efeitos tóxicos ao metabolismo (Fase 2) (MUNNS, 2005), sendo tais efeitos o que separa claramente as espécies e genótipos que diferem na tolerância ou sensibilidade à salinidade (MUNNS, 2002).

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 compartmentalizá-los no vacúolo e ficam dispersos pelo citoplasma, inibindo a atividade de algumas enzimas (MUNNS, 2005).

A toxicidade dos sais ocorre como resultado da absorção e da acumulação de certos íons tóxicos como o sódio, o cloreto e o sulfato (NAWAZ *et al.*, 2010). O acúmulo excessivo de Na^+ e Cl^- também pode ocasionar desbalanceamento nutricional, visto que diminui a absorção de outros nutrientes minerais, como o K^+ , o Ca^{2+} e o Mn^{2+} e reduz o crescimento das plantas (YU *et al.*, 2012). Portanto, mostra-se interessante a seleção de plantas tolerantes à salinidade que tentam manter a concentração de K^+ elevada na parte aérea (MUNNS *et al.*, 2000).

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 compartmentalização 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 estádio 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). 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). Sob condições salinas, o processo de expansão celular *per si* é afetado negativamente, visto que ocorrem modificações na atividade metabólica da parede celular e na deposição de materiais, que reduzem sua elasticidade. Desta forma, o processo de formação da parede celular secundária é antecipado, tornando a parede celular rígida, ocasionando diminuição na pressão de turgescência necessária para o crescimento e divisão celular (ASLAN *et al.* 2011). Além disso, 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. Semelhantemente, Azevedo Neto *et al.* (2004), verificaram reduções no crescimento em oito genótipos de milho submetidos à 100 mM de NaCl. 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 (MILLER *et al.*, 2010). 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). Em células vegetais, as ROS também podem ser produzidas nos peroxissomos, no citosol, na membrana plasmática e no apoplasto (Figura 1).

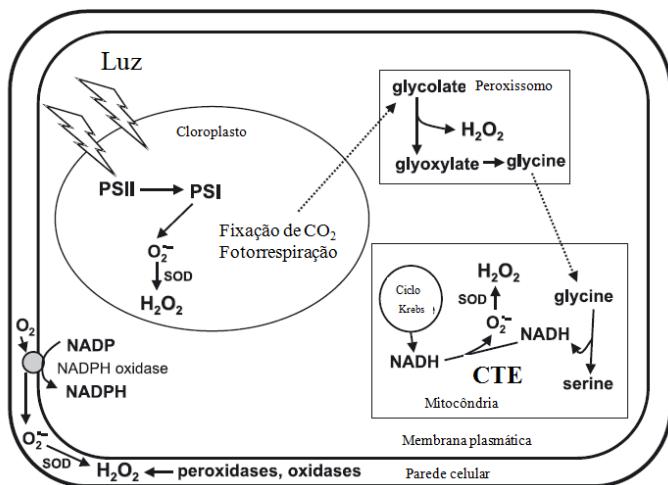


Figura 1. Principais sítios de produção de ROS em células vegetais (Adaptado de ŠLESAK, *et al.*, 2007).

O cloroplasto é a principal fonte de produção de ROS, visto que altas quantidades de $\cdot\text{O}_2^-$ e de H_2O_2 são originadas nesta organela, especialmente sob condições de estresse abiótico em que a taxa de fixação de carbono encontra-se reduzida (TAKAHASHI; MURATA, 2008). Adicionalmente, os cloroplastos podem produzir o oxigênio singuleto a partir das moléculas de clorofila excitadas (JASPERS; KANGASJARVI, 2010).

Em tecidos não fotossintetizantes, as mitocôndrias são as maiores fontes de ROS, mas em células fotossintetizantes, sua contribuição é considerada pequena em comparação com os cloroplastos (NAVROT *et al.*, 2007). O estado redox da cadeia de transporte de elétron mitocondrial é um importante indicador do estado de energia celular e da produção de ROS, especialmente o $\cdot\text{O}_2^-$ a partir dos complexos I e III, e do estado de redução da ubiquinona (TAYLOR *et al.*, 2009).

A terceira maior fonte de ROS intracelular são os peroxissomos. Nessas organelas se encontra a enzima oxidase do glicolato que produz o H_2O_2 oriundo da conversão do glicolato em gioxilato na via fotorrespiratória (JASPERS; KANGASJARVI, 2010; MILLER *et al.*, 2010). A atividade da enzima oxidase do glicolato exerce função relevante para o metabolismo vegetal, especialmente sob condições de estresses abióticos. Nestes casos, observa-se redução do grau de abertura estomática acompanhado de redução na disponibilidade de CO_2 para a enzima rubisco, exacerbando o processo de fotorrespiração e produção de glicolato nos cloroplastos (FOYER; NOCTOR, 2009). O glicolato é direcionado para os peroxissomos onde é oxidado pela ação da enzima oxidase do glicolato levando à produção de H_2O_2 .

O H_2O_2 também pode ser produzido no citosol, na membrana plasmática e no apoplastro por várias oxidases e peroxidases de parede celular (ŠLESAK, *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 $\cdot\text{O}_2^-$ que, por sua vez, pode ser convertido em H_2O_2 no apoplastro espontaneamente ou pela atividade da enzima dismutase do superóxido (BOLWELL *et al.*, 2002; APEL; HIRT, 2004; JASPERS; KANGASJARVI, 2010).

As ROS são metabólitos importantes e estão envolvidas com os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como os de apoptose e 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). Embora se tenha o conhecimento de que quando em excesso as ROS possam causar danos oxidativos às células, os estudos têm mostrado que estas desempenham um papel fundamental em plantas, como a transdução de sinal, mediação das respostas contra patógenos e estresses ambientais, morte celular programada e estímulos de desenvolvimento das plantas (MITTLER *et al.* 2004; TORRES; DANGL, 2005). As ROS podem induzir a modificação da expressão gênica (GILL; TUTEJA, 2010).

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 , que 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 2). 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).

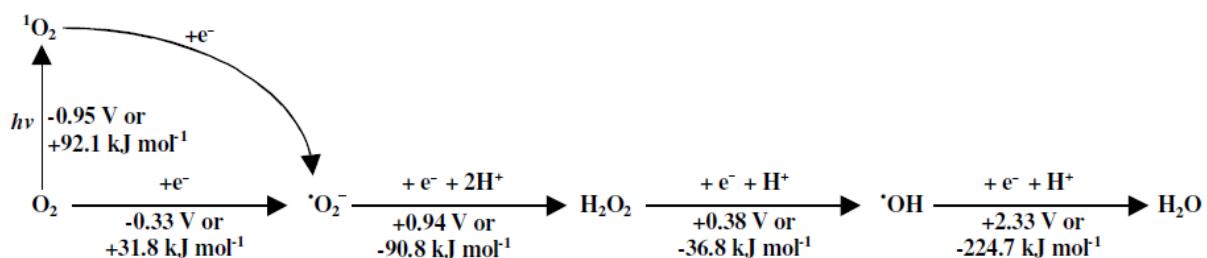


Figura 2. Etapas da via de redução monovalente do O_2 à H_2O , com os respectivos valores do potencial de oxidorredução padrão e da variação de energia livre padrão (AZEVEDO NETO *et al.*, 2008).

O oxigênio singlet (${}^1\text{O}_2$) 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 2). 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 2). 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 (Fe^{2+} , 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; MILLER *et al.*, 2010). O acúmulo de ROS tem efeitos sobre o metabolismo que podem provocar mudanças significativas no crescimento, no desenvolvimento e na produção vegetal, porque danificam proteínas, ácidos nucléicos e lipídios essenciais para a estrutura da membrana (NOCTOR; FOYER, 1998a; 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).

Portanto, as ROS exercem duas funções opostas; como moléculas prejudiciais quando em excesso, e como benéficas quando atuam na transdução de sinal. Assim, é importante o controle na quantidade produzida de ROS nas células vegetais durante o metabolismo normal, bem como em resposta a diferentes tipos de estresse (MILLER *et al.*, 2010).

2.4. As enzimas do sistema antioxidativo

Os efeitos nocivos das ROS nas plantas podem ser reduzidos ou eliminados por meio de sistemas de defesa enzimático e não enzimático (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 glutationa, GR). Por outro lado, o sistema de defesa não-enzimático é formado por antioxidantes de baixa massa molecular, hidrofílicos, como o ascorbato e a glutationa reduzida e lipofílicos, como os tocoferóis e os carotenoides (APSE; BLUMWALD, 2002; CHINNUSAMY *et al.*, 2005; AZEVEDO NETO *et al.*, 2008).

A SOD catalisa a conversão do $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 e oxigênio molecular (GILL; TUTEJA, 2010). O H_2O_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 remove o $\cdot\text{O}_2^-$ e, portanto, diminui o risco de formação de $\cdot\text{OH}$ pela reação de Haber-Weiss que ocorre na presença de íons metálicos (GILL; TUTEJA, 2010). 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; GILL; TUTEJA, 2010). 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. De acordo com Lee *et al.* (2007), plantas de *Festuca arundinacea* superexpressando as enzimas Mn-SOD e APX tornaram-se tolerantes a uma variedade de estresses abióticos.

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.*, 1987). 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). Todas as isoformas de SOD são codificadas pelo genoma nuclear e direcionadas para os seus respectivos compartimentos subcelulares por uma sequência amino-terminal (GILL; TUTEJA, 2010).

A CAT elimina o H₂O₂ convertendo-o a H₂O e O₂ e é encontrada principalmente nos peroxissomos e glioxisomos. Ela atua na remoção do peróxido de hidrogênio gerado na fotorrespiração, na β-oxidação dos ácidos graxos e no catabolismo das purinas (XIONG; ZHU, 2002; GILL; TUTEJA, 2010). A CAT exibe alta afinidade por H₂O₂, podendo atuar sobre este antes mesmo que 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 (H₂O₂). Para Gill *et al.* (2010), a CAT é a enzima eliminadora de H₂O₂ que apresenta a mais elevada taxa catalítica. Uma molécula de CAT pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de H₂O₂ em H₂O e O₂ por minuto. 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.* (2004), trabalhando com *Bruguiera parviflora* cultivada hidroponicamente 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. Em milho, Scandalios (1990) verificou a presença de três genes (*cat1*, *cat2* e *cat3*) que codificam três isoformas da enzima catalase (CAT-1, CAT-2 e CAT-3). Os genes são encontrados em cromossomos diferentes, sendo diferencialmente expressos e independentemente regulados. As isoformas CAT-1 e CAT-2 estão localizadas nos peroxissomos e no citosol, enquanto a CAT-3 encontra-se nas mitocôndrias. Hsu e Kao (2007) relataram que o pré-tratamento de mudas de arroz com H₂O₂ resultou em aumento na atividade da CAT e conferiu tolerância a uma subsequente exposição ao estresse por Cd.

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). Acredita-se que a APX exerce importante papel na eliminação de ROS conferindo proteção às células de plantas superiores, algas, euglenas e outros organismos (GILL; TUTEJA, 2010). Existem pelo menos quatro isoformas de APX em diferentes compartimentos celulares: nos tilacóides (tAPX), nas membranas dos glioxisomos (gmAPX), no estroma dos cloroplastos (sAPX), e no citosol (cAPX) (NOCTOR; FOYER, 1998b). Essa enzima apresenta maior afinidade pelo H_2O_2 do que as CAT e demais peroxidases, exercendo função crucial sob condições de estresse (GILL *et al.*, 2010). Badawi *et al.* (2004), observaram que a superexpressão da APX em *Nicotiana tabacum* conferiu tolerância à seca e à salinidade nas plantas. 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 visam prevenir o estresse oxidativo em organismos fotossintetizantes. Ademais, estudos 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, as plantas possuem o ciclo do ascorbato-glutatona (Figura 3). Inicialmente, a APX decompõe o H_2O_2 a água, utilizando o ascorbato como doador de elétrons com a concomitante formação de monodesidroascorbato (MDHA). 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 glutatona reduzida (GSH). Por sua vez, a glutatona oxidada (GSSG) formada é regenerada pela enzima redutase

da glutationa (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).

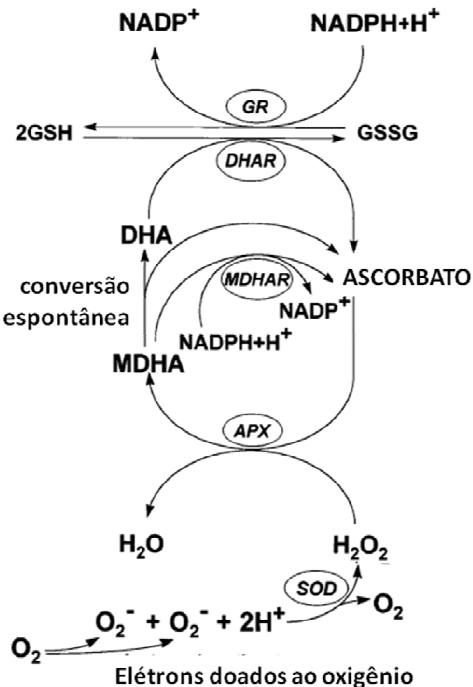


Figura 3. Ciclo do ascorbato-glutationa (adaptado de NOCTOR; FOYER, 1998a).

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). A GPX também decompõe o ácido-3-indol-acético (AIA), atua na biossíntese de lignina e na defesa das plantas contra estresses bióticos, eliminando o excesso de H_2O_2 produzido (GILL *et al.*, 2010). A GPX utiliza substâncias aromáticas como o guaiacol e o pirogalol como doadores de elétrons e, em raras ocasiões (1%), usa também o ascorbato (ASADA, 1999). Ela se apresenta 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 (GILL *et al.*, 2010). Dessa forma, muitos estudos têm mostrado uma correlação entre tolerância à salinidade e 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.

Além disso, mesmo em plantas sensíveis, um aumento da tolerância à salinidade foi obtido por meio do pré-tratamento com H₂O₂, como demonstrado em monocotiledôneas como o arroz (UCHIDA *et al.*, 2002) e milho (GONDIM *et al.*, 2010; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005). Nesses estudos, o H₂O₂ aplicado no sistema radicular ou nas sementes, foi capaz de estimular a atividade das enzimas do sistema antioxidativo.

2.5. O sistema antioxidativo não-enzimático

Sob condições de estresse abiótico, antioxidantes de baixo peso molecular como o ascorbato, a glutatona e os tocoferóis podem alterar a expressão gênica, levando à aclimatação das plantas à salinidade (MILLER *et al.*, 2010). Esses antioxidantes atuam como reguladores do estado redox das células através de sua ação direta sobre as ROS, modulando a indução de respostas de aclimatação ou de morte celular programada (FOYER; NOCTOR, 2005).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos destaca-se o ascorbato, visto que as plantas apresentam concentrações desse antioxidante tão elevadas quanto as de clorofila (MCKERSIE; LESHEN, 1994). Os teores de ascorbato podem alcançar aproximadamente 10% do total de carboidratos solúveis da planta (NOCTOR; FOYER, 1998a). O ascorbato atua como um redutor contra muitos radicais livres, minimizando os danos ocasionados pelo estresse oxidativo. Além disso, encontra-se relacionado a outras funções fisiológicas como o crescimento e a diferenciação das plantas (FOYER, 1993). Em *Arabidopsis*, o ascorbato parece exercer uma função importante na proteção das plantas contra o estresse salino, uma vez que o mutante deficiente na produção de ascorbato mostrou, sob condições de salinidade, concentrações mais elevadas de H₂O₂ do que o tipo selvagem, sendo o acréscimo diretamente relacionado a uma diminuição na razão ascorbato reduzido/ascorbato total e a uma menor atividade das enzimas do ciclo ascorbato-glutatona (HUANG *et al.*, 2005). O acúmulo de H₂O₂ ocasionou também redução nos teores de clorofila e na assimilação de CO₂. A aplicação exógena de ascorbato mostrou-se eficiente em reduzir os efeitos deletérios da salinidade no crescimento e na peroxidação de lipídios em plantas de trigo (ATHAR *et al.*, 2008), grão-de-bico (BELTAGI, 2008) e de tomate (SHALATA; NEUMANN, 2001).

A glutatona é um tripeptídeo (Glu-Cys-Gly) cuja função antioxidante pode ser atribuída à presença de grupos sulfidrila da cisteína (RENNEBERG, 1982). Nas plantas, ela pode ser encontrada em muitos tecidos, células e compartimentos celulares, sendo seus teores mais elevados no claro do que no escuro e diminuídos pela idade (McKERSIE; LESHEN, 1994). Além disso, sua quantidade é maior no cloroplasto, porém também pode ser encontrada no citosol. A glutatona está envolvida fisiologicamente no metabolismo do enxofre e na defesa das plantas (NOCTOR; FOYER, 1998a). A glutatona pode reagir diretamente com o oxigênio singuleto e com os radicais 'O₂' e 'OH e desta forma atuar como uma substância eliminadora de ROS. Trabalhos mostram que os teores de glutatona

aumentam sob condições de estresse hídrico, em plantas de girassol (SGHERRI; NAVARI-IZZO, 1995) e de estresse salino, em linhagens de células de amendoim (JAIN *et al.*, 2002). Yu *et al.* (2002) observaram que o pré-tratamento de sementes de *Vigna radiata* L. com H₂O₂ aumentou os teores de glutationa e conferiu tolerância das plantas ao frio. Adicionalmente, tem sido verificado que a manutenção de uma elevada razão glutationa reduzida/glutationa oxidada exerce uma função importante na tolerância à salinidade e à seca, em plantas de tomate, *Myrothamnus flabellifolia*, e trigo (SHALATA; NEUMANN 2001; KOCSY *et al.*, 2002; KRANNER *et al.* 2002).

As plantas apresentam diferentes peroxidases capazes de eliminar de modo rápido e eficiente o excesso de H₂O₂, porém, essas enzimas atuam em conjunto com os antioxidantes, ascorbato e glutationa (MITTLER; Poulos 2005). Hoque *et al.* (2007), observaram que a salinidade reduziu os teores de ascorbato e glutationa reduzidos bem como a atividade das enzimas do ciclo do ascorbato-glutationa em plantas de tabaco e que a aplicação exógena de prolina e glicina betaina aumentaram a atividade dessas enzimas.

O α-tocoferol (ou vitamina E) é um antioxidante lipofílico capaz de eliminar ROS e proteger os lipídios da oxidação (ASADA 2006; LI *et al.* 2008). Ele pode ser encontrado tanto em tecidos fotossintetizantes como não fotossintetizantes (McKERSIE; LESHEN, 1994). Em plantas de tabaco, tem sido verificado que a superexpressão da enzima tocoferol ciclase, que está envolvida na biosíntese da vitamina E, aumentou seus teores e conferiu tolerância à seca (LIU *et al.* 2008).

2.6. 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 os solutos orgânicos ou osmólitos, tais como 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; TÜRKAN; DEMIRAL, 2009), 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; TÜRKAN; DEMIRAL, 2009).

Um aminoácido que tende a se acumular sob condições de estresse hídrico e salino é a prolina. A este se atribui a capacidade de atuar como um soluto compatível e/ou uma substância eliminadora de ROS (CHEN; DICKMAN, 2005). O acúmulo de prolina sob condições de desidratação ocorre principalmente devido ao aumento de sua biossíntese e à diminuição de sua degradação (TÜRKAN; DEMIRAL, 2009). A prolina é sintetizada nos plastídios e no citosol, e é degradada a L-glutamato nas mitocôndrias (TÜRKAN; DEMIRAL, 2009).

O aumento na síntese de prolina sob condições de seca ou salinidade está associado com a diminuição da acidose citoplasmática e com a manutenção de elevadas razões NADP⁺/NADPH requeridas pelo metabolismo (HARE; CRESS, 1997). Dessa forma, a prolina parece contribuir para o estabelecimento de um estado redox aceitável nas células (BABIYCHUK *et al.*, 1995).

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). Demiral e Türkcan (2006), trabalhando com dois cultivares de arroz com tolerância diferencial à salinidade, constataram que o estresse salino levou ao acúmulo nos teores de prolina nas folhas de ambos os cultivares. Contudo, o incremento mostrou-se mais acentuado no cultivar tolerante, o que sugere o envolvimento da prolina no ajustamento osmótico sob condições de salinidade. Entretanto, Vaidyanathan *et al.* (2003), também 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).

2.7. Salinidade e fotossíntese

A fotossíntese e o crescimento celular estão entre os processos primários afetados pela salinidade (MUNNS *et al.*, 2006). Entretanto, a fim de evitar os efeitos tóxicos da salinidade na fotossíntese e em outros processos metabólicos, algumas plantas são capazes de promover a compartimentalização dos íons tóxicos no vacúolo para minimizar sua concentração no citosol (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Conforme Munns *et al.* (2006), a presença do Na^+ em uma concentração superior a 100 mM poderia inibir a atividade de várias enzimas, incluindo aquelas relacionadas à fotossíntese. De acordo com Chaves, Flexas e Pinheiro (2009), as enzimas que requerem o K^+ como cofator são sensíveis às elevadas concentrações de Na^+ ou altas razões Na^+/K^+ . De acordo com Prado (2008), o K^+ promove maior difusividade do CO_2 nas células do mesofilo e também ocasiona aumento na atividade carboxilásica da enzima rubisco, contribuindo assim para uma maior taxa fotossintética. Além

de atuar como um importante ativador enzimático, o K⁺ exerce outra função fisiológica fundamental às plantas, como o controle do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos (PRADO, 2008). Adicionalmente, a deficiência de K⁺ pode afetar a fotossíntese através da redução do conteúdo de clorofila ou por alterações na quantidade e estrutura dos centros de reação fotossintética (ZHAO; OOSTERHUIS; BEDNARZ, 2001). Portanto, a tolerância do sistema fotossintético à salinidade poderia ser alcançada através da exclusão ou compartimentalização dos íons tóxicos, como o Na⁺, bem como pela manutenção de elevadas concentrações de K⁺ (NAWAX *et al.*, 2010).

A redução na taxa fotossintética pela salinidade pode ocorrer direta ou indiretamente. Diretamente, devido à diminuição na disponibilidade de CO₂ causada pela limitação de sua difusão através dos estômatos e das células mesofílicas (FLEXAS *et al.*, 2007) ou por limitações nas reações envolvidas no metabolismo fotossintético (LAWLOR; CORNIC, 2002). Para Nawax *et al.* (2010), a redução direta da fotossíntese pode ocorrer devido aos efeitos estomáticos, não estomáticos ou a ambos. Entretanto, acredita-se que a fotossíntese seja limitada principalmente em virtude do fechamento dos estômatos, causado pela redução do potencial hídrico do solo, quando em presença do excesso de sais (DAVIES; ZHANG, 1991).

Indiretamente, a fotossíntese pode ser reduzida devido aos efeitos nocivos gerados pelas ROS produzidas sob condições de estresse (CHAVES; OLIVEIRA, 2004), as quais podem afetar seriamente a maquinaria fotossintética (ORT, 2001). Embora a formação de ROS nos cloroplastos seja um evento normal da fotossíntese, os estímulos ambientais podem ocasionar distúrbios no metabolismo do cloroplasto, intensificando ainda mais essa produção e daí levar à danos oxidativos (SILVEIRA *et al.*, 2010). Além disso, o fechamento dos estômatos ocasionado pela salinidade reduz o funcionamento normal do ciclo de Calvin e causa desequilíbrio entre as fases fotoquímica e de redução do carbono, aumentando a razão

NADPH/NADP⁺ no estroma. O aumento desta razão se deve em grande parte à diminuição no conteúdo de NADP⁺, o principal acceptor de elétrons do fotossistema I (DEMIRAL; TURKAN, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2010). Neste caso, a ferredoxina reduzida produzida durante o transporte de elétrons na fase fotoquímica da fotossíntese pode transferir seus elétrons para o O₂ no fotossistema I, levando à formação de radicais 'O₂' por meio da reação de Mehler, e este radical pode iniciar reações em cadeia que levam à produção de outras ROS (HELDT, 1997).

Adicionalmente, o acúmulo excessivo de íons tóxicos nas folhas inibe a taxa fotossintética por meio de mecanismos não-estomáticos, reduzindo o transporte de elétrons nos cloroplastos, o conteúdo total de clorofila, e, consequentemente, causando um decréscimo na eficiência do fotossistema II (TAIZ; ZEIGER, 2004; M'RAH *et al.*, 2006).

2.8. 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). As halófitas são naturalmente adaptadas à salinidade e preferem ambientes salinos. Essas plantas realizam a compartmentalização de sais em células ou tecidos de modo que não tragam danos ao metabolismo (FLOWERS; COLMER, 2008; GALVAN-AMPUDIA; TESTERINK, 2011). Adicionalmente, muitas halófitas apresentam adaptações morfológicas nas folhas que lhes permitem otimizar o uso da água, bem como realizar a extrusão do sal absorvido. Entre estas adaptações destacam-se o acúmulo de cera e a presença de glândulas excretoras de sal (GALVAN-AMPUDIA; TESTERINK, 2011).

Conforme Yu *et al.* (2012), as glicófitas apresentam graus variados de tolerância à salinidade, podendo ser agrupadas da seguinte forma: I- plantas tolerantes à salinidade, subdividindo-se em plantas moderadamente tolerantes (milho, girassol e batata) e plantas tolerantes (trigo, beterraba e outras). II- Plantas sensíveis à salinidade, subdividindo-se em plantas moderadamente sensíveis (como o tomate e a soja) e plantas sensíveis (leguminosas como o grão de bico e a lentilha).

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. Por outro lado, Yu *et al.* (2012), afirmam que a tolerância à salinidade engloba adaptações naturais de uma planta para combater os níveis excessivos de sal em seu meio circundante. 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 os efeitos da elevada concentração de sais no citoplasma. As halófitas, plantas tolerantes à salinidade, apresentam ambos os mecanismos mencionados. Elas excluem o sal eficientemente, embora também compartmentalizem 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 para exclusão dos sais, de maneira que seus processos metabólicos são afetados negativamente com o aumento das concentrações de sais solúveis na solução do solo (GREENWAY; MUNNS, 1980).

As plantas desenvolveram uma grande variedade de mecanismos bioquímicos para enfrentar o estresse salino tais como: (i) acumulação seletiva de íons e controle do transporte para as folhas; (ii) compartmentalização 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 homônios vegetais (PARIDA; DAS, 2005).

2.9. O peróxido de hidrogênio como uma molécula sinalizadora

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um componente vital para o desenvolvimento, metabolismo e homeostase de diferentes organismos (BIENERT *et al.*, 2006). Nas plantas, o H_2O_2 é uma das ROS mais estáveis, estando envolvida nos processos de aclimatação, defesa e desenvolvimento (ŚLESAK *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 (VRANOVA *et al.*, 2002). Além disso, canais transportadores de água na membrana plasmática, 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 danosas para uma grande variedade de macromoléculas, entretanto, mecanismos de eliminação dessa ROS parecem ter surgido também nos primórdios do processo de evolução (BIENERT *et al.*, 2006).

Até pouco tempo atrás, o peróxido de hidrogênio e outras ROS eram vistas unicamente como metabólitos tóxicos para a célula. Porém, estudos têm demonstrado que as ROS, especialmente o H_2O_2 , atuam como moléculas sinalizadoras e são produzidas e controladas pelo metabolismo, sendo benéficas a baixas concentrações e prejudiciais quando em excesso (UCHIDA *et al.*, 2002; GECHEV; HILLE, 2005; QUAN *et al.*, 2008). Estudos genéticos e bioquímicos confirmam que o H_2O_2 funciona como uma molécula sinalizadora em plantas sob condições de estresses bióticos e abióticos, estando envolvida no fechamento estomático, gravitropismo radicular e tolerância à deficiência de oxigênio (NEILL *et al.*, 2002). Para Petrov e Van Breusegem (2012), o H_2O_2 atua como regulador de vários processos fisiológicos, como o fortalecimento da parede celular, a senescência, a produção de

fitoalexinas, a fotossíntese, a abertura estomática e o ciclo celular. Contudo, os efeitos biológicos do H₂O₂ mostram-se dependentes não apenas de sua concentração, mas também do seu sítio de produção, do estádio de desenvolvimento da planta e da prévia exposição da planta a outros tipos de estresse (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012). Rutschow *et al.* (2011) sugerem que baixas concentrações de H₂O₂ geram um suave sinal de estresse que pode aliviar o estresse mais intenso, por aumento do fluxo de solutos e nutrientes. Inversamente, o acúmulo de quantidades mais elevadas de H₂O₂ produz uma forte mensagem de estresse, semelhante à invasão de um patógeno, o que pode conduzir à morte celular.

Uma grande variedade de estímulos ambientais conduz a um aumento transiente na concentração de H₂O₂, sendo este fenômeno visto como um sinal que transmite os estímulos iniciais para uma resposta final no metabolismo (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012). Para Miller *et al.* (2008), a elevação na concentração de H₂O₂ seria percebida por fatores de transcrição sensíveis à modificações no estado redox da célula e então iniciariam as cascatas de reações. De acordo com Hardin *et al.* (2009), uma possível alternativa para a percepção do H₂O₂ em plantas seria a oxidação da metionina a sulfóxido de metionina em proteínas associadas à percepção de sinais oxidativos, sendo que isso ocasionaria modificação no estado de fosforilação das mesmas e, consequentemente, em suas atividades enzimáticas.

O peróxido de hidrogênio possui algumas características que o credenciam a atuar como um mensageiro secundário: I- sua produção é facilmente regulada por diversos estímulos, principalmente através de NADPH-oxidases e peroxidases; II- é uma molécula pequena e relativamente móvel, podendo transportar informações entre os diferentes compartimentos celulares; III- é capaz de modular as atividades de sinalização de outros componentes e cascatas de reações, com diferentes resultados biológicos, incluindo os que conduzem à sua própria síntese (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012). De acordo com Bienert *et al.* (2006), o H₂O₂ atua nas células como um mensageiro secundário, aumentando o fluxo de íons Ca²⁺ e

modificando o padrão de proteínas e de expressão gênica. Para Agarwal *et al.* (2005), o H₂O₂ produzido em resposta à aplicação exógena de Ca²⁺ 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 antioxidativas. Recentemente, Petrov e Van Breusegen (2012), afirmaram que o H₂O₂ interfere na produção dos fatores de transcrição e que estes podem induzir uma reprogramação massiva da produção de transcritos, que por sua vez podem desencadear respostas como a defesa das plantas contra estresses ou a morte celular. Embora o H₂O₂ 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).

2.10. Aclimatação ao estresse salino

A figura 4 mostra uma sequência de etapas que vão desde a percepção do estresse até a aclimatação das plantas à salinidade (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010). Inicialmente, as raízes da planta percebem os dois componentes da salinidade, o osmótico e o iônico, acreditando-se ser a membrana plasmática o local dessa percepção. Após a percepção desses componentes, serão produzidos um ou mais mensageiros secundários que iniciarão o processo de transdução do sinal.

As alterações no metabolismo resultarão na produção de proteínas transportadoras envolvidas no processo de exclusão e compartmentalização de íons tóxicos (ZHU, 2001). Além disso, poderá ocorrer a síntese de solutos orgânicos, e estes auxiliarem no processo de homeostase osmótica e iônica, osmoproteção e desintoxicação celular (BRAY *et al.*, 2000). Entre as alterações no metabolismo induzidas pela salinidade pode-se destacar também o desbalanceamento hormonal (TAIZ; ZEIGER, 2004) e o aumento da produção de ROS

(BRAY *et al.*, 2000). Podendo esta última gerar um estresse secundário denominado de estresse oxidativo.

Deste modo, na parte final desta sequência de alterações induzidas pela salinidade, observa-se a homeostase (osmótica, iônica ou bioquímica) e a desintoxicação. O equilíbrio ou desequilíbrio das diferentes homeostases resultará em plantas tolerantes ou susceptíveis ao estresse salino (Figura 4) (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010).

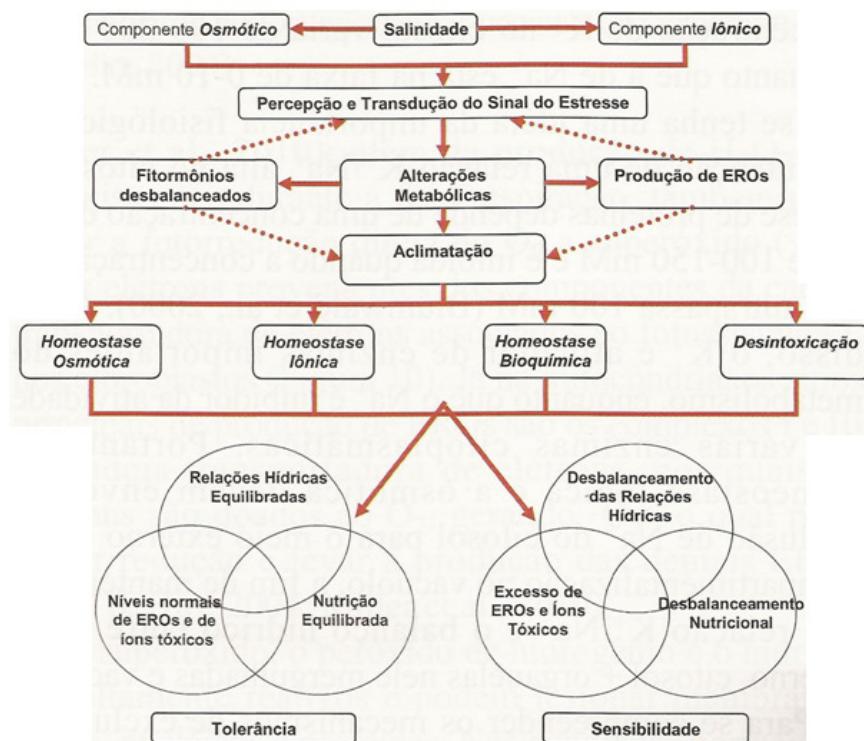


Figura 4. Sequência de mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem quando as plantas são submetidas ao estresse salino (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010).

2.11. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio

Alguns estudos têm sido realizados com a aplicação exógena de H_2O_2 , a fim de conferir tolerância das plantas à estresses abióticos. Uchida *et al.* (2002), demonstraram que plantas de arroz pré-tratadas com H_2O_2 ou com óxido nítrico (NO) no sistema radicular

apresentaram 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 H₂O₂ na solução nutritiva induziu aclimatação das plantas à salinidade. Em plantas de milho, a produção de H₂O₂ também foi aumentada em resposta ao estresse de frio e sua aplicação exógena ao sistema radicular aumentou a tolerância do milho ao resfriamento (PRASAD *et al.*, 1994). Gong *et al.* (2001), observaram que a aplicação exógena de H₂O₂ ao sistema radicular aumentou a resistência das plântulas de milho aos estresses por calor, frio, seca e salinidade, resultado que sugere que o H₂O₂ pode funcionar como molécula sinalizadora, iniciando o processo de tolerância cruzada. Wahid *et al.* (2007), trabalhando com plantas de trigo provenientes de sementes pré-tratadas com H₂O₂ e submetidas à salinidade, observaram que o pré-tratamento conferiu tolerância à salinidade nas plantas.

Alguns estudos também foram feitos utilizando a pulverização das folhas com H₂O₂ no sentido de induzirem aclimatação das plantas contra estresses abióticos. Gechev *et al.* (2002), em *Nicotiana tabacum* induziram tolerância das plantas contra o estresse oxidativo, gerado por alta intensidade luminosa ou por um agente inibidor da catalase, por meio de pulverização foliar com H₂O₂. Semelhantemente, Gao *et al.* (2010) detectaram tolerância ao calor em plantas de *Cucumis sativus* visto que a pulverização das plantas com H₂O₂ contribuiu para o aumento na atividade das enzimas antioxidativas, diminuiu a peroxidação dos lipídios e protegeu a ultraestrutura dos cloroplastos. Contudo, não há informações se o pré-tratamento por pulverização foliar com H₂O₂, o qual se trata de um sistema de fácil aplicação, utilizável em diferentes estádios de desenvolvimento da planta e de baixo custo para os agricultores, também é capaz de induzir aclimatação das plantas ao estresse salino.,

O acréscimo nos níveis de H₂O₂ em resposta a vários estresses, constitui-se num fator chave que medeia o fenômeno de aclimatação e conduz à chamada tolerância cruzada, em que

a exposição prévia a um estresse, pode induzir tolerância a uma exposição subsequente a um outro tipo de estresse (NEILL *et al.*, 2002).

2.12. 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 *Poales*, família *Poaceae*, 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, com base na massa seca é de 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de lipídios (PAES *et al.*, 2006). É um alimento altamente nutritivo e, ao contrário do trigo e do arroz que são refinados durante seus processos de industrialização, o milho é utilizado com sua casca rica em fibras, as quais são importantes para a eliminação das toxinas do organismo humano (ABIMILHO, 2011).

A cultura do milho vem apresentando grandes avanços tecnológicos nesses últimos anos. Até meados da década de 90, as melhores propriedades alcançavam produtividades médias entre 7.500 a 8.000 kg/ha e, mesmo assim, estavam concentradas em poucos agricultores (PEIXOTO, 2010). A elevação do preço internacional do produto devido à sua utilização na produção de etanol nos Estados Unidos fez com que o cultivo do milho acelerasse seu ritmo no Brasil (LACERDA, 2012). Apesar da baixa produtividade média no

Brasil, hoje ao redor de 3.700 kg/ha, em inúmeras regiões existem propriedades que apresentam médias acima de 10.000 kg/ha. Também já não é mais uma exceção encontrar lavouras com produtividades entre 12.000 e 14.000 kg/ha em muitas regiões e por inúmeros agricultores brasileiros (PEIXOTO, 2012).

No semiárido do nordeste do Brasil, a cultura apresenta-se extremamente importante. Ao lado da mandioca e do feijão, o milho apresentou elevada expansão nos últimos anos. Contudo, o milho foi a única cultura a ter sua produção duplicada enquanto as outras duas obtiveram incrementos mais reduzidos. Comparando-se as médias dos períodos compreendidos entre 1998-2000 e 2008-2010, nessa região, o milho aumentou sua produção em 126%, enquanto as culturas da mandioca e do feijão aumentaram em apenas 26 e 6%, respectivamente (LACERDA, 2012).

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 (PAES *et al.*, 2006). Pode ser utilizado também para a produção de etanol, setor responsável pelo aumento do consumo do cereal nos Estados Unidos (BRASIL, 2007). Cerca de 70% da produção mundial de milho são destinadas à alimentação animal, podendo esse percentual chegar a 85%, em países desenvolvidos (PAES *et al.*, 2006). Constitui-se o principal ingrediente para a produção de ração, cujo consumo tem aumentado nos últimos anos (BRASIL, 2007). Além de ser utilizado como maior componente da ração de aves e suínos, é empregado na produção de silagem de grão úmido ou da planta inteira na bovinocultura (MORAES, 2011). Em termos gerais, apenas 15% de toda a produção mundial destinam-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES *et al.*, 2006). O consumo humano direto se dá por meio de milho verde e de maneira indireta na composição de outros alimentos, como a polenta, biscoitos, matéria-prima de bolos e pães ou ainda transformado em

vários subprodutos, como margarinas, maionese, balas, xaropes e bebidas (MORAES, 2011). 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 principal fonte de energia para muitas pessoas que vivem no semiárido. 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 utilizados 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 do país, 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 de 2006 da Associação Brasileira das Indústrias de Milho, 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).

Com relação à cultura do milho e a salinidade, diversos trabalhos tentam elucidar os efeitos deletérios do estresse salino sobre o crescimento das plantas de milho. Conforme Daker (1976), o milho é considerado uma cultura moderadamente tolerante à salinidade. Contudo, de acordo com Mass (1993), apresenta-se como uma cultura moderadamente sensível à salinidade, apresentando, 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. Já Blanco, Lourenço e Folegatti (2005), trabalhando com um híbrido de milho cultivado em vasos com solo franco-arenoso e irrigadas com água com condutividades elétricas variando de 0,3 a $4,5 \text{ dS m}^{-1}$, verificaram que a produção de grãos foi afetada para salinidades da água de irrigação acima de $2,71 \text{ dS m}^{-1}$, com decréscimo de 32,7% para cada aumento unitário de salinidade acima desse valor. Blanco, Lourenço e Folegatti (2003), observaram que a emergência das plântulas de milho foi afetada quando a condutividade elétrica da água de irrigação era superior a $1,65 \text{ dS m}^{-1}$, contudo a produção de matéria seca das plântulas só foi afetada para valores acima de $3,08 \text{ dS m}^{-1}$. Diferentemente dos trabalhos anteriores, Azevedo Neto e Tabosa (2000) trabalharam com plantas de milho crescendo sob condições hidropônicas e verificaram redução significativa da produção de matéria seca da parte aérea apenas para níveis de salinidade da solução nutritiva superiores a $9,6 \text{ dS m}^{-1}$ para o cultivar sensível e de 12 dS m^{-1} para o cultivar tolerante à salinidade. Assim, verifica-se que há uma série de trabalhos com plantas de milho crescendo sob condições salinas; contudo, os mesmos empregam diferentes estratégias experimentais (diferentes tipos de solo ou condições hidropônicas, diferentes cultivares, diferentes estádios de desenvolvimento da planta), o que dificulta a comparação dos resultados bem como uma classificação do milho com relação à tolerância ou susceptibilidade à salinidade.

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. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO. **O Cereal que enriquece a alimentação humana.** 2011. Disponível em <<http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>>. Acesso em: 26 de junho 2012.

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.

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. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, p. 391-396, 2006.

ASADA, K. The waterewater cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 235-241, 1992.

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.

ASLAM, R.; BOSTAN, N.; NABGHA-E-AMEN¹, MARIA, M.; SAFDAR, W. A critical review on halophytes: Salt tolerant plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 7108-7118, 2011.

ATHAR, H.R.; KHAN, A.; ASHRAF, M. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 224-231, 2008.

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**, New Delhi: IK International, 2008, pp. 58-82.

AZEVEDO-NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C. E. B.; GOMES-FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 87-94, 2006.

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; 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 I análise do crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, p.159-164, 2000.

BABIYCHUK, E.; KUSHNIR, S.; BELLES-BOIX, E.; VANMONTAGU, M.; INZÉ, D. *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts towards the thiol-oxidizing drug diamide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26224–26231, 1995.

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.

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.

BELTAGI, M.S. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) induced anabolic changes for salt tolerance in chick pea (*Cicer arietinum* L.) plants. **African Journal of Plant Science**, v. 2, p. 118-123, 2008.

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

BLANCO, F. F.; LOURENÇÃO, M. S.; FOLEGATTI, M. V. **Tolerância do milho à salinidade da água de irrigação.** In: XV Congresso Nacional de Irrigação e Drenagem e Simpósio Internacional de Uso das Águas Subterrâneas. Teresina: ABID Governo do desenvolvimento do Piauí, 2005.

BLANCO, F. F.; LOURENÇÃO, M. S.; FOLEGATTI, M. V. **Tolerância do milho e da soja à salinidade.** In: Congresso Brasileiro de Fertirrigação. João Pessoa: UFPB, 2003.

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.; ÖZDEMIR, 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadeia produtiva do milho /** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura; Pinazza, L.A. (Eds). – Brasília: IICA MAPA/SPA, 108p., 2007.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.; GRUISEM, 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: POTAPOS, 1993. p. 63-145.

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).

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551-560, 2009.

CHAVES, M.M.; OLIVEIRA, M.M.;. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2365-2384, 2004.

CHEN, C.; DICKMAN, M. B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 3459-3464, 2005.

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.; GOMEZ-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**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1976.

DAVIES, W. J; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 55-76, 1991.

DEMIRAL, T.; TÜRKAN, I. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p.72–79, 2006.

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.cnpmms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>>. Acesso em: 06 de março de 2007.

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, pp. 383, 1997.

FAGERIA, N. K.; SOARES-FILHO, W.; GHEYI, H. R. Melhoramento genético vegetal e seleção de cultivares tolerantes à salinidade. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. D.; LACERDA, C. F. (Eds.). **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT Sal, 2010, pp. 205-218.

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 2007.

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

FLEXAS J.; DIAZ-ESPEJO, A.; GALME'S, J.; KALDENHOFF, R.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, p.1284–1298, 2007.

FLOWERS, T. J.; COLMER, T. D. Salinity tolerance in halophytes. **New Phytologist**, v. 179, p. 945-963, 2008,

FOYER, C. H. Ascorbic acid. In: ALSCHER, R. G.; HESS, J. L (Eds.) **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press 31-58, 1993.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 861–905, 2009.

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

GALVAN-AMPUDIA, C. S.; TESTERINK, C. Salt stress signals shape the plant root. **Current Opinion in Plant Biology**, v.14, p. 296–302, 2011.

GAMA, P. B. S.; TANAKA, K.; ENEJI, A. E.; ELTAYEB, A. E.; EL-SIDDIG, K. Salt-induced stress effects on biomass, photosynthetic rate, and reactive oxygen species-cavenging enzyme accumulation in common bean. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, p. 837-854, 2009.

GAO, Y.; GUO, Y.; LIN, S.; FANG, Y.; BAI, J. Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves, **Scientia Horticulturae**, v. 126, p. 20-26, 2010.

GECHEV T. S.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death, **The Journal of Cell biology**, v. 168 p.17-20, 2005.

GECHEV, T. S.; GADJEV, I.; VAN BREUSEGEM, F.; INZÉ, D.; DUKIANDJIEV, S.; TONEVA, V.; MINKOV, I. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 708-714, 2002.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 27, p. 812–818, 2010.

GONDIM, F. A.; GOMES-FILHO, E.; COSTA, J. H. E.; ALENCAR, N. L. M.; PRISCO, J. T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 62-71, 2012.

GONDIM, F. A.; GOMES-FILHO, E.; LACERDA, C. F.; PRISCO, J. T. AZEVEDO NETO, A.D.; MARQUES, E. C. Pretreatment with H_2O_2 in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 103-112, 2010.

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_2O_2 . **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.

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

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

HARDIN S. C.; LARUE, C. T.; OH, M. H.; JAIN, V.; HUBER, S. C. Coupling oxidative signals to protein phosphorylation via methionine oxidation in *Arabidopsis*. **Biochemical Journal** v. 422, p. 305–312, 2009.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79–102, 1997.

HELDIT, H. W. **Plant biochemistry and molecular biology**. New York: Oxford university Press, 1997.

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 H₂O₂ across water channels. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 2053–2066, 2000.

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.

HOQUE, M. A.; BANU, M. N.; OKUMA, E.; AMAKO, K.; NAKAMURA, Y.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco bright yellow-2 suspension-cultured cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1457–1468, 2007.

HSU, Y. T.; KAO, C. H. Heat shock-mediated H₂O₂ accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings. **Plant Soil**, v. 300, p. 137–147, 2007.

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.

HUANG, C.; HE, W.; GUO J.; CHANG, X.; SU, P.; ZHANG, L. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 3041–3049, 2005.

JAIN, M.; CHOUDHARY, D.; KALE, R. K.; BHALLA-SARIN, N. Salt and glyphosate-induced increase in glyoxalase I activity in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea*). **Physiologia Plantarum**, v. 114, p. 499–505, 2002.

JASPERS, P.; KANGASJARVI, J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. **Physiologia Plantarum**, v. 138, p. 405–413, 2010.

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.

KHADRI, M.; TEJERA, N. A.; LLUCH, C. Sodium chloride-ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60 p. 211–218, 2007.

KOCSY, G.; SZALAI, G.; GALIBA, G. Induction of glutathione synthesis and glutathione reductase activity by abiotic stresses in maize and wheat. **Scientific World Journal**, v. 2, p. 1699–1705, 2002.

KRANNER, I.; BECKETT, R. P.; WORNIK, S.; ZORN, M.; PFEIFHOFER, H. W. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. **The Plant Journal**, v. 31, p.13–24, 2002.

LACERDA, R. **A cultura do milho e seca**. 2012. Jornal da cidade, 6 de maio de 2012. Disponível em: <<http://cenariosdesenvolvimento.blogspot.com.br/2012/05/cultura-do-milho-e-seca.html>>. Acesso em: 27 de junho 2012.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 275–294, 2002.

LEE, S. H.; AHSAN, N.; LEE, K. W.; KIM, D. H.; LEE, D. G.; KWAK, S. S.; KWON, S. Y.; KIM, T. H.; LEE, B. H. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p.1626-1638, 2007.

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

LIU, X.; HUA, X.; GUO, J.; QI, D.; WANG, L.; LIU, Z.; JIN, Z.; CHEN, S.; LIU, G. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1275–1280, 2008.

LI, Y.; WANG, Z.; SUN, X.; TANG, K. Current opinions on the functions of tocopherol based on the genetic manipulation of tocopherol biosynthesis in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 1057–1069, 2008.

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.

MASS, E. V. Testing crops for salinity tolerance. In: MARANVILLE, J.W.; BALIJAR, B.V.; DUNCAN, R.R.; YOHE, J.M. (Eds.) **Proceding 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^a 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.

MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signalling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 481–489, 2008.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 453–467, 2010.

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

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 443–462, 2010.

MITTLER, R.; POULOS, T.L. Ascorbate peroxidase. In: SMIRNOFF, N. (Eds.) **Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants**, Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005, pp. 87–100.

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

MITTOVA, V.; 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.

MORAES, M. G. **Perspectivas para a cultura do milho no Brasil**. 2011. Disponível em: <<http://www.paginatural.com.br/artigo/2202/perspectivas-para-a-cultura-do-milho-no-brasil>> Acesso em: 28 de junho de 2012.

M'RAH, S.; OUERGHI.; BERTHOMIEU, C.; HAVAUX, M.; JUNGAS, C.; HAJJI, M.; GRIGNON, C.; LACHAAT, M. Effects of NaCl on the growth, ion accumulation and photosynthetic parameters of hellungiella halophila. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.1022-1031, 2006.

MUNNS, R. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and others cereals. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1025-1043, 2006.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance. **New Phytologist**, v. 167, p. 645-663, 2005.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.

MUNNS, R.; HARE, R. A.; JAMES, R. A.; REBETZKE, G. J. Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 51, p. 69-74, 2000.

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

NAWAZ, K.; HUSSAIN, K.; MAJEEED, A.; KHAN, F.; AFGHAN, S.; ALI, K. Fatality of salt stress to plants: Morphological, physiological and biochemical aspects. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 5475-5480, 2010.

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.

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, 1998a.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C3 photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity. **Jounal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1895-1908, 1998b.

ORT D.R. When there is too much light. **Plant Physiology**, v. 125, p. 29-32, 2001.

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

PEIXOTO, C. M. **Avanços tecnológicos da cultura do milho no Brasil**. 2010. Disponível em:<<http://www.pioneersementes.com.br/ArtigosDetalhe.aspx?Id=155>>. Acesso em: 26 de junho de 2012.

PELEG, Z.; APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering Salinity and Water-Stress Tolerance in Crop Plants: Getting Closer to the Field. **Advances in Botanical Research**, v. 57, p. 405-443, 2011.

PETROV, V. D.; VAN BREUSEGEM, F. Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. **AoB PLANTS**, Invited review, 2012.

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.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**. São Paulo: Editora UNESP, 2008.

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.

PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. D.; LACERDA, C. F. (Eds.). **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSAL, 2010, p.p 143-159.

QUAN, L.; ZHANG, B.; SHI, W.; LI, H. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network, **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 2-18, 2008.

RENNEBERG, H. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. **Photochemistry**, v. 21, p. 2771-2781, 1982.

RIBEIRO, M. R. Origem e classificação dos solos afetados por sais. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. D.; LACERDA, C. F. (Eds.), **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT Sal, 2010, p.p 12-19.

RIBEIRO, M. R; BARROS, M. F. C. ; FREIRE, M. B. G. S. Química dos Solos Salinos e Sódicos. In: MELO, V.F.; ALLEONI, L.R.F (Eds.). **Química e Mineralogia do Solo**. 1^a ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009, v. II, p. 449-484.

RIBEIRO, M. R.; FREIRE, F. J.; MONTENEGRO, A. A. A. Solos Halomórficos no Brasil: Caracterização, Gênese, Classificação, Uso e Manejo Sustentável. In: CURI, N.; MARQUES, J. J.; GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M.; LOPES, A. S.; ALVAREZ, V.H (Eds.), **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 3, 2003, p. 165-208.

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

RUTSCHOW H. L.; BASKIN T. I.; KRAMER, E. M. Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1817–1826, 2011.

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.

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

SCANDALIOS, J.G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, v. 28, p. 1-41, 1990.

SGHERRI, C.; NAVARI-IZZO, F. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defense mechanisms. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 25-30, 1995.

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

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.

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

ŚLESAK, 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 2008.

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**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends Plant Science**, v. 13, p. 178-182, 2008.

TAYLOR, N. L.; TAN, Y. F.; JACOBY, R. P.; MILLAR, A.H. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 367-378, 2009.

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.

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

TÜRKAN, I.; DEMIRAL, T. Recent developments in understanding salinity tolerance **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 2–9, 2009.

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.

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 H₂O₂ 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.; YING, Y.; CHEN, J.; WANG, X. Transgenic Arabdopsis overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. **Plant Science**, v. 167, p. 671-677, 2004.

WILLEKENS, H., CHAMNONGPOL, S., DAVEY, M., SCHRAUDNER, M., LANGEBAARTELS, C., VAN MONTAGU, M. INZÉ, D., VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. **The EMBO Journal**, v.16, p. 4806-4816, 1997.

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.

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.

YU, C-W.; MURPHY, T. M.; SUNG, W-W.; LIN, C-H. H₂O₂ treatment induces glutathione accumulationand chilling tolerance in mung bean. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 1081 – 1087, 2002.

YU, S.; WANG, W.; WANG, B. Recent Progress of Salinity Tolerance Research in Plants. **Russian Journal of Genetics**, v. 48, p. 497–505, 2012.

ZHAO, D.; OOSTERHUIS, D. M.; BEDNARZ, C. W. Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyl content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. **Photosynthetica**, v. 39, p. 103-109, 2001.

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

4. OBJETIVOS

4.1. Gerais

Testar o efeito da aplicação foliar com H₂O₂ no processo de aclimatação das plantas de milho ao estresse salino, estudando os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos.

4.2. Específicos

Utilizando-se plantas sob condições controle e de estresse salino previamente pulverizadas com água destilada ou soluções de H₂O₂, 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 de solutos orgânicos (proteínas solúveis, carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e prolina) e inorgânicos (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) em folhas;
- Estudar a atividade das enzimas antioxidativas (SOD, CAT, APX e GPX) espectrofotometricamente, bem como suas isoenzimas por métodos eletroforéticos em folhas;
- Determinar a peroxidação de lipídios em folhas;
- Estudar a expressão da enzima CAT por RT-PCR em folhas;
- Determinar o teor de H₂O₂ em folhas e raízes;
- Analisar os teores relativos de clorofila, os teores relativos de água e as trocas gasosas (condutância estomática, fotossíntese, taxa de transpiração e concentração interna de CO₂);
- Analisar os teores de ascorbato e glutationa bem como seus estados redox em folhas e raízes.

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A presente tese foi dividida em três experimentos independentes, que resultaram na produção de três capítulos, cada um correspondendo a um artigo científico, sendo apresentados os que já foram publicados conforme as normas de cada revista.

O primeiro capítulo, denominado “**Efeitos do H₂O₂ no crescimento e acúmulo de solutos em plantas de milho sob estresse salino**”, foi publicado na revista Ciência Agronômica, v. 42, n. 2, p. 373-381, abr-jun, 2011.

O segundo capítulo, intitulado “**Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize**” foi publicado na Revista Plant Physiology and Biochemistry, v. 56, p. 62-71, 2012.

O terceiro capítulo intitula-se “**Efeitos da pulverização foliar com H₂O₂ na área foliar, nas trocas gasosas e nos teores de H₂O₂, ascorbato e glutationa em plantas de milho sob estresse salino**” e encontra-se formatado conforme as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

As descrições detalhadas dos experimentos encontram-se independentemente descritas nos tópicos “Material e Métodos” de cada capítulo.

Capítulo I

(Artigo publicado na revista Ciência Agronômica, v. 42, n. 2, p. 373-381, abr-jun, 2011)

Efeitos do H₂O₂ no crescimento e acúmulo de solutos em plantas de milho sob estresse salino¹

Effects of H₂O₂ on growth and accumulation of solutes in maize plants under salt stress

Franklin Aragão Gondim², Enéas Gomes-Filho^{3*}, Elton Camelo Marques⁴ e José Tarquinio Prisco³

Resumo - Este trabalho teve como objetivos estudar os efeitos da aplicação foliar de H₂O₂ no crescimento e nos teores de solutos orgânicos e inorgânicos de plantas de milho crescendo sob condições salinas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação sob condições hidropônicas. Oito dias após a semeadura, as plântulas foram pulverizadas com água destilada (controle) ou solução aquosa de H₂O₂ na concentração de 10 mM e, 48 h após o início da pulverização, foram submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM. Foram realizadas duas coletas: com 96 e 240 h do início da pulverização. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 (NaCl a 0 ou 80 mM) x 2 (H₂O₂ a 0 ou 10 mM), com cinco repetições. Os dados de cada tempo de coleta (96 h ou 240 h) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). O pré-tratamento de pulverização das plantas de milho com H₂O₂ induziu aclimatação das plantas de milho ao estresse salino, revertendo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade no crescimento. Este efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, a

*Autor para correspondência

¹ Parte da tese do primeiro autor

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Quixadá-CE, Brasil e Programa de Pós-graduação em Bioquímica, CC/UFC, Fortaleza-CE, Brasil, aragaofg@ifce.edu.br

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, CC/UFC, Caixa Postal 6039, 60.455-970, Fortaleza-CE, Brasil, egomesf@ufc.br, jtpisco@uol.com.br

⁴ Programa de Pós-graduação em Bioquímica, CC/UFC, Fortaleza-CE, Brasil, eltoncmarques@gmail.com

um maior acúmulo de proteínas solúveis, carboidratos solúveis e NO_3^- , bem como a um menor acúmulo de íons tóxicos (Na^+ e Cl^-) nas folhas.

Palavras-chave: Aclimatação. Estresse salino. Peróxido de hidrogênio. Pré-tratamento. *Zea mays*

Abstract - The aim of this study was to evaluate the effects of foliar application of H_2O_2 on plant growth and on the levels of organic and inorganic solutes in maize plants under salt stress. The experiments were conducted in a greenhouse under hydroponic conditions. Eight days after sowing, the seedlings were sprayed with a 10 mM H_2O_2 solution or with distilled water (as a control). Forty-eight hours after the beginning of spraying, they were subjected to treatment with NaCl at 80 mM. Two harvests were carried out: 96 and 240 hours after the start of spraying. The experimental design was completely randomized following a factorial arrangement 2 (NaCl at 0 or 80 mM) x 2 (H_2O_2 at 0 or 10 mM), with five replicates. The data for each harvest time (96 or 240 h) were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared through Tukey's test ($P \leq 0.05$). The results showed that foliar application of H_2O_2 produced acclimation of the plants to salt stress, decreasing the deleterious effects of salinity on the growth of the maize. This effect can be attributed, at least partially, to a larger build up of proteins, and soluble carbohydrates and NO_3^- as well as lower levels of Cl^- and Na^+ in the foliage.

Key words: Acclimation. Salt stress. Hydrogen peroxide. Pre-treatment. *Zea mays*.

Introdução

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 tanto nas áreas irrigadas como nas não irrigadas. A maioria das áreas afetadas pela salinidade ocorre naturalmente, porém, uma

proporção significativa de áreas cultiváveis tem se tornado salina em virtude de retiradas da vegetação e irrigações com águas salinas (MUNNS, 2005).

O milho 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 varie entre diferentes cultivares (MASS, 1993).

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 na 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).

O processo de aclimatação a determinadas condições de estresse se constitui numa alternativa para aumentar a capacidade das plantas de sobreviverem a condições adversas. A aclimatação 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 aclimatação induziu uma tolerância cruzada (NEILL et al., 2002). Dentre os processos de aclimatação 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 aclimatação das plantas à salinidade. Recentemente, Gondim et al. (2010), trabalhando com plantas de milho provenientes de sementes pré-tratadas com H_2O_2 e submetidas à salinidade e Wahid et al. (2007), com plantas de trigo também oriundas de

sementes pré-tratadas com H₂O₂, observaram que o pré-tratamento conferiu tolerância à salinidade nas plantas. Contudo, não há informações se o pré-tratamento por pulverização foliar com H₂O₂ também é capaz de induzir aclimatação das plantas ao estresse salino, visto que se trata de um sistema mais simples, de baixo custo e de fácil utilização pelos produtores.

No presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da pulverização foliar de peróxido de hidrogênio sobre o crescimento e o acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos em folhas de plantas de milho submetidas à salinidade.

Material e métodos

As sementes de milho (*Zea mays* L.) do híbrido triplo BRS 3003 foram provenientes do Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará. O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Após seleção e desinfestação com solução de hipoclorito de sódio a 0,7%, as sementes foram semeadas em copos plásticos (200 mL) contendo vermiculita e irrigadas diariamente com água destilada, sob condições de casa de vegetação. Decorridos cinco dias da semeadura, as plântulas foram transferidas para bandejas de plástico contendo 10 L de solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950), diluída 1:2, onde permaneceram por dois dias para aclimatação. 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.

Após o período de aclimatação (oito dias após a semeadura), as plântulas foram pulverizadas com água destilada (controle) ou solução de H₂O₂ na concentração de 10 mM (contendo o detergente Tween 20 a 0,025%, a fim de quebrar a tensão superficial e facilitar a penetração). As aplicações foram realizadas às 06:30 h e repetidas após 24 h. Em seguida, as

plântulas com 48 h após o início da pulverização foram submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM, sendo a adição de sal realizada de forma parcelada (40 mM por dia). Portanto, as plantas foram submetidas a quatro tratamentos: **1.** pulverizadas com água destilada e crescendo em ausência de salinidade (controle/água); **2.** pulverizadas com solução de H₂O₂ e crescendo em ausência de salinidade (controle/H₂O₂); **3.** pulverizadas com água destilada e crescendo sob condições salinas (salino/água); **4.** pulverizadas com solução de H₂O₂ e crescendo sob condições salinas (salino/H₂O₂).

Foram realizadas duas coletas: com 96 h após o início da pulverização, quando as plantas já se encontravam sob condições salinas (1 dia a 80 mM de NaCl); e com 240 h após o início da pulverização (6 dias a 80 mM de NaCl). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 (NaCl a 0 ou 80 mM) x 2 (H₂O₂ a 0 ou 10 mM), com cinco repetições. Os dados de cada tempo de coleta (96 h ou 240 h) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Durante as coletas, as plantas foram separadas em raiz, limbo e colmo + bainha, quando então se determinou, apenas na última coleta, a área foliar (AF), o que foi feito com um integrador de área foliar (LI-3100 Area Meter, Li-Cor., Inc, Lincoln, Nebraska, USA). Para as análises bioquímicas, utilizou-se a 1^ª folha completamente expandida, a contar do ápice, sendo este material, por ocasião das coletas, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -25°C até sua utilização. O restante do material vegetal foi deixado em estufa com circulação forçada de ar a 60°C para as determinações das matérias secas da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST). A razão de área foliar (RAF) foi determinada usando-se a seguinte fórmula:

$$RAF = (AF) (MST)^{-1} (\text{cm}^2 \text{ g}^{-1})$$

O extrato base para a determinação dos teores de proteínas solúveis e solutos orgânicos foi obtido a partir da maceração, em almofariz, de 1 g de folha fresca em nitrogênio líquido para obtenção do pó. Em seguida, adicionaram-se 4,0 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.

Os teores de proteínas solúveis foram determinados de acordo com o método descrito por Bradford (1976); os de carboidratos solúveis, de acordo com Dubois et al. (1956); os de N-aminossolúveis, pelo método de Yemm e Cocking (1955) e os de prolina, conforme Bates et al. (1973). Os teores dos solutos orgânicos foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF (matéria fresca), exceto para os de proteína que foram expressos em mg Prot g^{-1} MF. Cada extrato foi dosado em duplicata.

O extrato base para determinação dos teores de solutos inorgânicos foi obtido a partir da maceração, em almofariz, de 0,5 g de folha fresca em nitrogênio líquido para obtenção do pó. Em seguida, adicionaram-se 5,0 mL de água desionizada. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a 3.000 x g durante 15 min.

Os teores de sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram determinados por fotometria de chama, os de cloreto (Cl^-) conforme Gaines et al. (1984), usando-se os reagente $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, sendo realizadas leituras de absorbância em 460 nm, utilizando-se NaCl como padrão. Os teores de NO_3^- foram determinados através do método do ácido salicílico (CATALDO et al., 1975) no qual se utiliza NaNO_3 como padrão e leituras de absorbância em 410 nm.

Resultados e discussão

De modo geral, não foram observadas interações significativas entre os fatores salinidade e peróxido de hidrogênio para os parâmetros MSPA, MSR e MST. Contudo,

principalmente no tempo de 240 h, foram observados os efeitos desses fatores isoladamente (TAB. 1). A salinidade reduziu o crescimento das plantas de milho, em comparação àquelas crescendo sob condições controle e a pulverização foliar com H₂O₂ foi eficaz em minimizar esse efeito apenas na última coleta (FIG. 1). Com relação à MSPA, com 96 h após a pulverização, não houve diferenças significativas entre os tratamentos empregados (FIG. 1A). Contudo, com 240 h, a MSPA das plantas do tratamento controle/H₂O₂ mostrou-se 21% superior àquela do tratamento controle/água, enquanto no tratamento salino/H₂O₂, houve um aumento de 75%, em relação ao tratamento salino/água. Com relação à MSR, verificou-se que as diferenças entre os tratamentos só foram significativas com 240 h após a primeira pulverização (FIG. 1B). Nesse mesmo tempo, a salinidade reduziu a MSR das plantas pulverizadas com água destilada (54% de redução em relação à média dos demais tratamentos), entretanto, não houve diferenças significativas entre as plantas submetidas às condições controle e aquelas submetidas à salinidade previamente pulverizadas com H₂O₂. A MST mostrou comportamento semelhante ao da MSPA. Com 240 h, o tratamento controle/H₂O₂ apresentou-se 17% superior ao do controle/água, enquanto no salino/H₂O₂, houve um aumento de 74%, em relação ao tratamento salino/água (FIG. 1C).

Tabela 1 – Valores do teste *F* para matéria seca da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST), área foliar (AF) e razão de área foliar (RAF) de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM)

Fontes de variação	MSPA		MSR		MST		AF	RAF
	96 h	240 h	96 h	240 h	96 h	240 h	240 h	240 h
Salinidade (S)	0,82 ^{ns}	461,36 ^{***}	9,26 ^{***}	5,52 [*]	2,77 ^{ns}	372,54 ^{***}	373,85 ^{***}	985,76 ^{***}
Peróxido (P)	2,65 ^{ns}	93,23 ^{***}	4,75 [*]	16,38 ^{***}	0,68 ^{ns}	93,78 ^{***}	31,53 ^{***}	60,86 ^{***}
S x P	3,05 ^{ns}	2,61 ^{ns}	3,85 ^{ns}	19,24 ^{***}	7,48 ^{ns}	7,22 [*]	0,49 ^{ns}	34,90 ^{***}

P*≤0,05; **P*≤0,001; ^{ns} não significativo

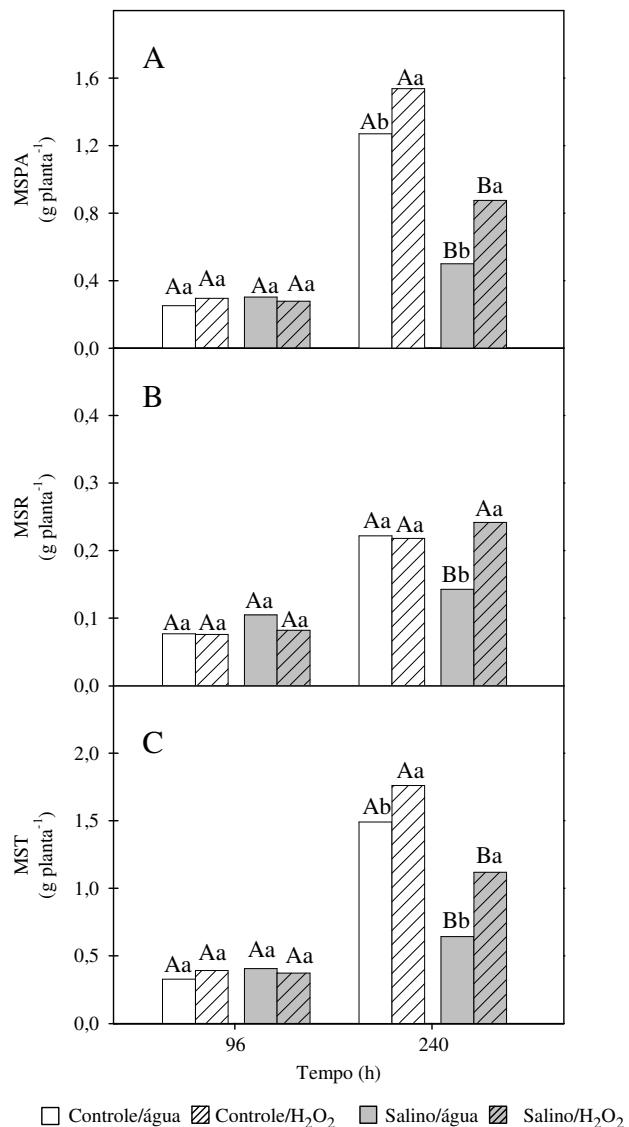


Figura 1 – Matéria seca da parte aérea (A), das raízes (B) e total (C) de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM). Em um mesmo tempo de coleta, valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H₂O₂, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Para a área foliar (AF), não foi observada interação significativa entre os fatores salinidade e H₂O₂, contudo, observaram-se efeitos desses fatores isoladamente. Já para a RAF, verificou-se interação entre os fatores salinidade e H₂O₂ (TAB. 1). Comparando-se a média dos tratamentos controle à média dos tratamentos salinos, verificou-se que a salinidade ocasionou uma redução de 70% na AF (FIG. 2A). Entretanto, a AF no tratamento controle/H₂O₂ mostrou-se 19% superior àquela do tratamento controle/água, enquanto

observou-se um aumento de 120% no tratamento salino/ H_2O_2 em relação ao tratamento salino/água. A RAF foi reduzida pela salinidade e isto se deveu a maior redução na MST (FIG. 1C e 2B). No entanto, o tratamento salino/ H_2O_2 apresentou valores de RAF 44% superiores ao do tratamento salino/água. Estes números se devem a uma menor redução na AF do tratamento salino/ H_2O_2 em comparação ao salino/água.

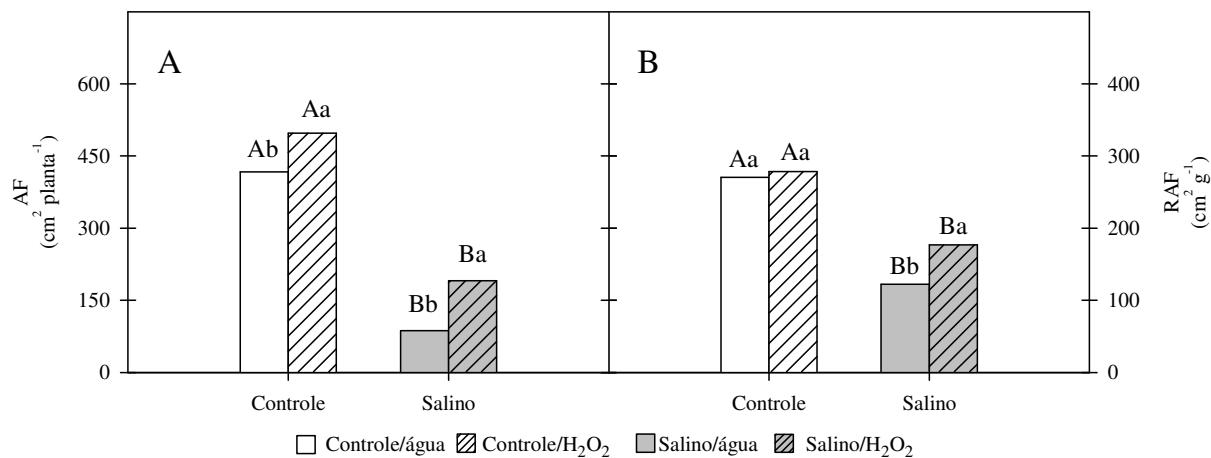


Figura 2 – Área foliar (A) e razão de área foliar (B) de plantas de milho sob condições controle ou salina ($NaCl$ a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM). Os dados referem-se à coleta realizada após 240 h do início da pulverização. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de $NaCl$ e H_2O_2 , respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Azevedo Neto et al. (2005), trabalhando com plantas de milho, observaram que o pré-tratamento com baixa concentração de H_2O_2 (1 μM) na solução nutritiva induziu tolerância à salinidade. Gondim et al. (2010), com plantas de milho provenientes de sementes pré-tratadas com H_2O_2 e submetidas à salinidade e Wahid et al. (2007), trabalhando com plantas de trigo também oriundas de sementes pré-tratadas, observaram que o pré-tratamento conferiu tolerância à salinidade nas plantas. Como citado, trabalhos anteriores aplicaram H_2O_2 no sistema radicular ou nas sementes, diferentemente do presente trabalho em que foi realizada pulverização foliar.

Para os teores de proteínas solúveis, houve interação significativa entre os fatores salinidade e H₂O₂ nos dois tempos de coleta estudados (TAB. 2). A salinidade reduziu os teores de proteínas solúveis no tratamento salino/água (FIG. 3A) em 28 e 30% aos 96 e 240 h, respectivamente, em relação ao tratamento controle/água. Contudo, observou-se que os teores mantiveram-se inalterados nas plantas pulverizadas com H₂O₂ e submetidas à salinidade. Em plantas submetidas a estresse salino, geralmente, se verifica uma redução na quantidade total de proteínas (PARIDA et al., 2004). No presente trabalho, foram observadas reduções nos teores de proteínas pela salinidade somente nas plantas pulverizadas com água destilada. Portanto, a pulverização com o H₂O₂ mostrou-se eficiente.

Tabela 2 – Valores do teste *F* para os teores de proteínas solúveis, carboidratos solúveis, prolina e N-aminossolúveis em folhas de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM)

Fontes de variação	Proteínas solúveis		Carboidratos solúveis		Prolina		N-aminossolúveis	
	96 h	240 h	96 h	240 h	96 h	240 h	96 h	240 h
Salinidade (S)	58,46 ***	8,37 *	16,57 ***	29,12 ***	0,32 ns	0,00023 ns	1,33 ns	127,99 ***
Peróxido (P)	33,77 ***	44,90 ***	64,65 ***	50,06 ***	3,15 ns	0,00011 ns	4,38 ns	66,96 ***
S x P	21,82 ***	15,63 ***	8,71 **	1,51 ns	0,59 ns	0,11 ns	9,21 ns	64,11 ***

P*≤0,05; *P*≤0,01; ****P*≤0,001; ns não significativo

Para os teores de carboidratos solúveis, constatou-se interação significativa entre os fatores salinidade e H₂O₂ apenas no tempo de 96 h, embora se tenha observado efeitos significativos dos fatores isoladamente no tempo de 240 h (TAB. 2). A pulverização com H₂O₂ levou a incrementos nos teores de carboidratos solúveis (FIG. 3B). Nas coletas realizadas com 96 e 240 h, o tratamento salino/H₂O₂ apresentou valores 36 e 32% superiores ao tratamento salino/água, respectivamente. O tratamento salino/H₂O₂ mostrou ainda valores 30 e 40% superiores às médias dos tratamentos controle, com 96 e 240 h, respectivamente. No presente trabalho, os teores de carboidratos solúveis foram aumentados pela salinidade e pela

pulverização com H_2O_2 . 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. Por outro lado, 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.

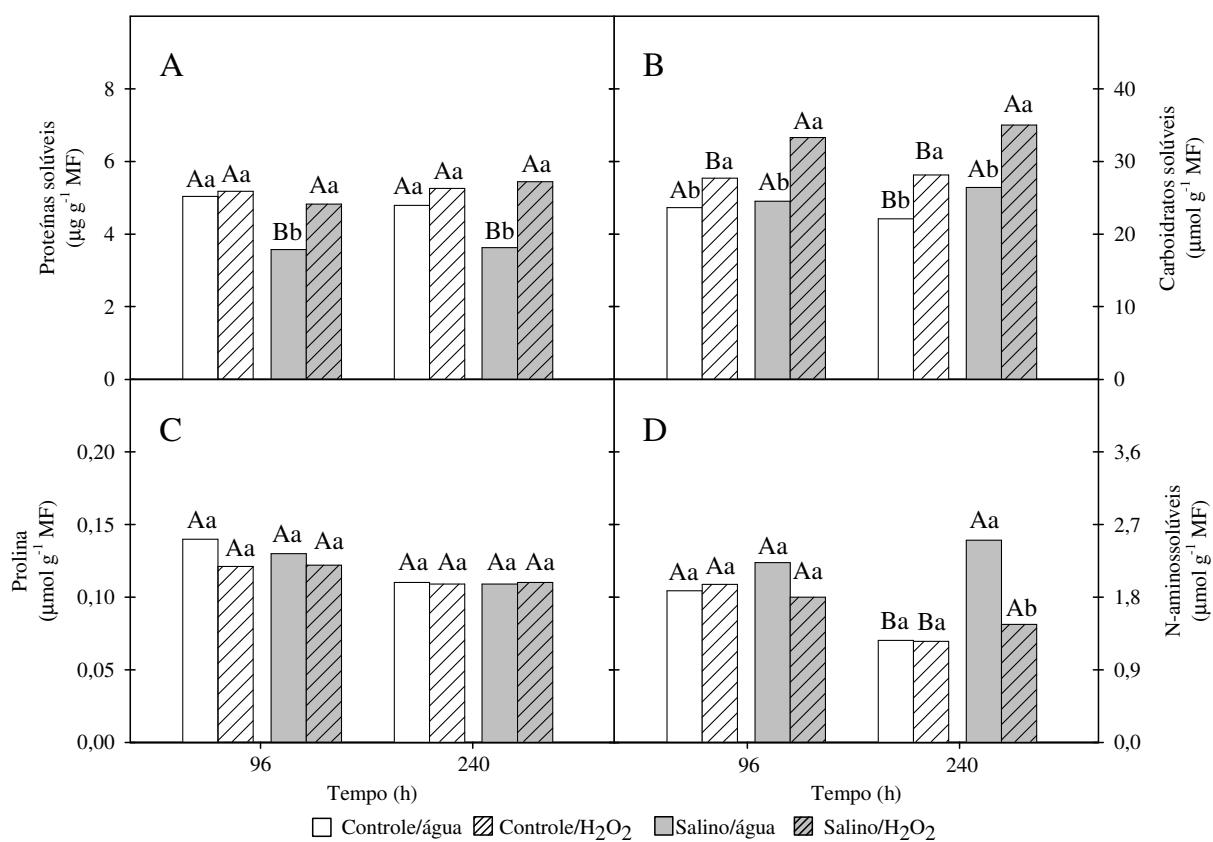


Figura 3 – Teores de proteínas solúveis (A), carboidratos solúveis (B), prolina (C) e N-aminossolúveis (D) em folhas de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM). Valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H_2O_2 , respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Não houve diferença significativa nos teores de prolina entre os tratamentos, no decorrer do período experimental (TAB. 2 e FIG. 3C). Portanto, o papel da prolina como

osmoprotetor ou como osmorregulador em plantas de milho pré-tratadas com água destilada ou H_2O_2 sujeitas ao estresse salino parece ter sido desprezível. 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).

No tempo de 96 h, não houve diferença significativa nos teores de N-aminossolúveis entre os tratamentos, porém, com 240 h, constatou-se interação entre os fatores salinidade e H_2O_2 (TAB. 2 e FIG. 3D). Os teores de N-aminossolúveis mostraram-se 88% superiores nas plantas do tratamento salino/água em comparação aos demais tratamentos. 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.

Dentre os solutos orgânicos analisados, os carboidratos solúveis, provavelmente, foram os que mais contribuíram para o ajustamento osmótico das plantas de milho sob condições salinas, destacando-se as plantas que receberam pulverização com H_2O_2 .

Para os teores de Na^+ , observou-se interação significativa entre os fatores salinidade e H_2O_2 apenas no tempo de 240 h. Entretanto, verificou-se efeito do fator salinidade, isoladamente no tempo de 96 h. Para os teores de Cl^- , o comportamento foi semelhante ao observado para Na^+ nos dois tempos de coleta, adicionando-se o efeito significativo apresentado pelo fator H_2O_2 (TAB. 3). A salinidade aumentou os teores de Na^+ (FIG. 4A) e Cl^- (FIG. 4B) das plantas de milho em comparação àquelas crescendo sob condições controle.

Após 96 h, a média dos tratamentos salinos apresentou valores de Na^+ e Cl^- 112 e 91%

maiores, respectivamente, em comparação à média dos tratamentos controle, com 240 h, observou-se que as plantas do tratamento salino/H₂O₂ apresentaram menor acúmulo

Tabela 3 – Valores do teste *F* para os teores de Na⁺, Cl⁻, K⁺ e NO₃⁻ em folhas de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM)

Fontes de variação	Na ⁺		Cl ⁻		K ⁺		NO ₃ ⁻	
	96 h	240 h	96 h	240 h	96 h	240 h	96 h	240 h
Salinidade (S)	85,47 ***	4070,32 ***	831,67 ***	1900,81 ***	1,03 ns	351,97 ***	3241,83 ***	672,30 ***
Peróxido (P)	0,68 ns	137,44 ***	5,84 *	148,09 ***	4,46 ns	1,58 ns	1,43 ns	15,49 ***
S x P	0,0090 ns	137,43 ***	3,30 ns	167,60 ***	3,60 ns	0,015 ns	0,33 ns	9,91 **

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; ns não significativo

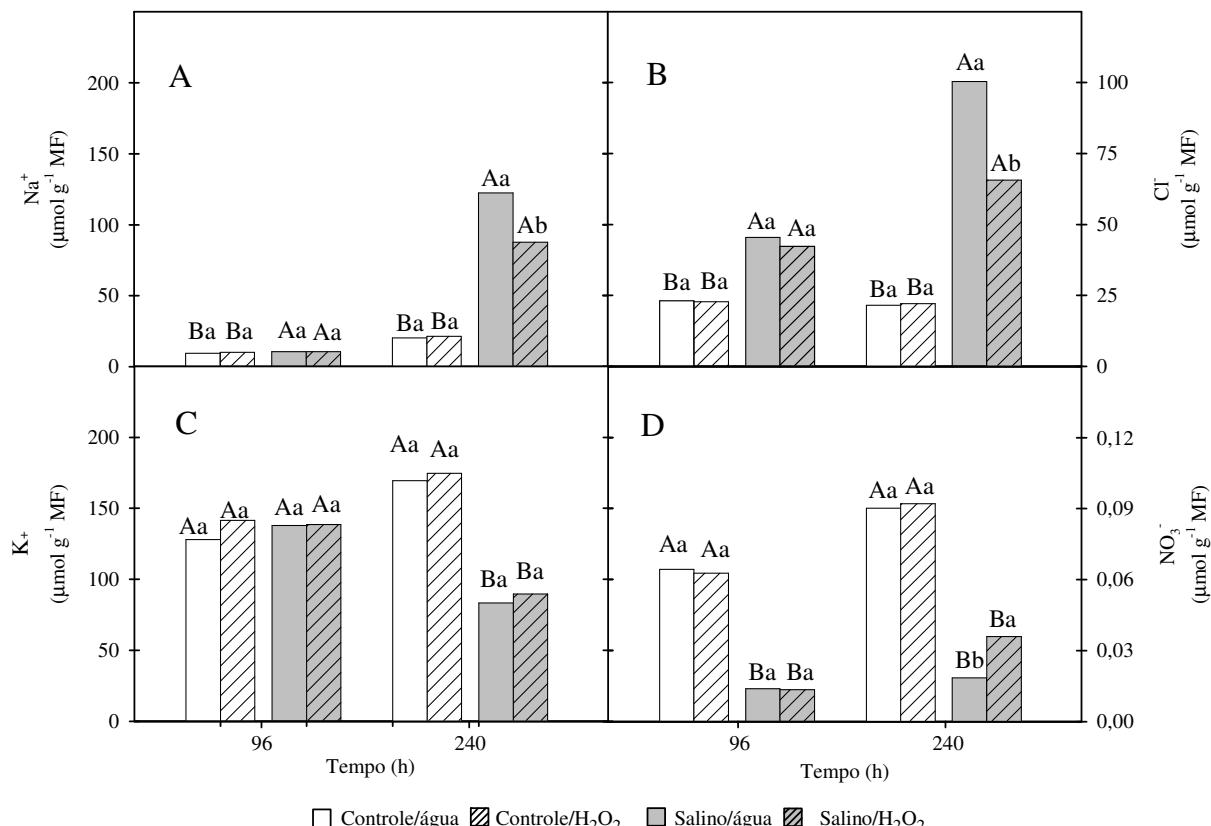


Figura 4 – Teores de Na⁺ (A), Cl⁻ (B), K⁺ (C) e NO₃⁻ (D) em folhas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM). Valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H₂O₂, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

destes íons tóxicos. As plantas do tratamento salino/água apresentaram teores de Na^+ e Cl^- 39 e 52% maiores que os respectivos tratamentos salino/ H_2O_2 . Aumentos nos teores de Na^+ e Cl^- nas folhas de plantas submetidas à salinidade também foram observados por outros autores (COSTA et al., 2003; AZEVEDO NETO et al., 2004), bem como melhoria nesses parâmetros em consequência do pré-tratamento com H_2O_2 (WAHID et al., 2007).

Com relação aos teores de K^+ , não foi observada interação significativa entre os fatores salinidade e H_2O_2 nos dois tempos de coleta, contudo, observou-se efeito do fator salinidade no tempo de 240 h (TAB. 3). Não houve diferenças significativas nos teores de K^+ (FIG. 4C) entre plantas pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 . Entretanto, com 240 h, observou-se que a salinidade ocasionou uma redução média de 50% nos teores de K^+ nas folhas das plantas de milho independente da pulverização aplicada. Em condições de estresse salino, os resultados sobre os teores de K^+ são variados. Enquanto alguns autores observaram aumentos (ERDEI; TALEISNIK, 1993, em milho; SILVA, 2003, em feijão-de-corda), outros observaram diminuições (AZEVEDO NETO et al., 2004, em milho; LACERDA et al., 2004, em sorgo). As diminuições nos teores de K^+ poderiam ser atribuídas às elevadas concentrações de Na^+ através do antagonismo que existe entre estes dois íons, visto que o Na^+ também pode entrar nas células radiculares por meio de canais de K^+ de baixa e alta afinidade (APSE; BLUMWALD, 2002).

Para os teores de NO_3^- , foi observada interação entre os fatores salinidade e H_2O_2 apenas no tempo de 240 h. Para o tempo de 96 h, constatou-se apenas efeito do fator salinidade isoladamente (TAB. 3). A salinidade ocasionou redução nos teores de NO_3^- (FIG. 4D) em relação às plantas dos tratamentos controle. Após 96 h, constatou-se que a média dos tratamentos controle mostrou-se 4,6 vezes maior do que a média dos tratamentos salinos. Com 240 h, a pulverização com H_2O_2 levou a incrementos nos teores de NO_3^- , tendo o tratamento salino/ H_2O_2 se mostrado 89% superior ao tratamento salino/água. O NO_3^- é um

dos elementos essenciais à planta, estando envolvido no crescimento e desenvolvimento das plantas, já que participa da constituição de muitas biomoléculas tais como proteínas, ácidos nucléicos, aminoácidos, coenzimas, vitaminas e pigmentos (DUBEY; PESSARAKLI, 1995).

No presente trabalho, verificou-se que o pré-tratamento por pulverização foliar com H_2O_2 mostrou-se eficiente em diminuir a acumulação de íons potencialmente tóxicos (Na^+ e Cl^-) e aumentar a acumulação de um íon potencialmente benéfico (NO_3^-). Semelhantemente ao presente trabalho, Wahid et al. (2007), trabalhando com plantas de trigo provenientes de sementes pré-tratadas com H_2O_2 e crescendo sob condições salinas, constataram diminuições nos teores de Cl^- e incrementos nos teores de NO_3^- em comparação com as plantas salinizadas provenientes de sementes não pré-tratadas. Contudo, diferentemente dos resultados aqui apresentados, Wahid et al. (2007), não encontraram diferenças significativas nos teores de Na^+ entre plantas oriundas de sementes pré-tratadas ou não com H_2O_2 e submetidas a salinidade, bem como detectaram incrementos nos teores de K^+ .

Conclusão

1. O pré-tratamento das plantas de milho por meio da pulverização com peróxido de hidrogênio induziu aclimatação das plantas ao estresse salino, revertendo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade no crescimento, podendo isso ser atribuído, pelo menos em parte, a um maior acúmulo de proteínas solúveis, carboidratos solúveis e NO_3^- bem como a menores acúmulos de Na^+ e Cl^- .

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal) pelos recursos financeiros.

Referências

APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 02, p. 146-150, 2002.

AZEVEDO NETO, A. D. *et al.* Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 01, p. 31-38, 2004.

AZEVEDO NETO, A. D. *et al.* Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 10, p. 1114-1122, 2005.

BATES, L. S. *et al.* Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 02, p. 205-207, 1973.

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, n. 01-02, p. 248-254, 1976.

CATALDO, D. A. *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 01, p. 71-80, 1975.

COSTA, P. H. A. *et al.* Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 03, p. 289-297, 2003.

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, n. 03, p. 247-257, 2005.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 03, p. 350-356, 1956.

DUBEY, R. S; PESSARAKLI, M. Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plants under stressful conditions. In: PESSARAKLI, M. **Handbook of plant and crop physiology**. New York: Marcel Dekker, 1995, p. 605-625.

ERDEI, L.; TALEISNIK, E. Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. **Physiologia Plantarum**, v. 89, n. 02, p. 381-387, 1993.

GAINES, T. P. *et al.* Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate. **Agronomy Journal**, v. 76, n. 03, p. 371-374, 1984.

GONDIM, F. A. *et al.* Pretreatment with H_2O_2 in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 02, p. 103-112, 2010.

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

KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, v. 40, n. 02, p. 482-487, 2000.

LACERDA, C. F. *et al.* Influência do cálcio sobre o crescimento e solutos em plântulas de sorgo estressadas com cloreto de sódio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 02, p. 289-295, 2004.

MASS, E. V. Testing crops for salinity tolerance. In: Workshop on Adaptation of plants to soil stress, Leincoln. **Proceedings...** Lincoln: INTSORMI, 1993. p. 234-247.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance. **New Phytologist**, v. 167, n. 03, p. 645-663, 2005.

NEILL, S. *et al.* Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 05, p. 388-395, 2002.

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. *et al.* Effects of salt on growth, ion accumulation photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees-Structure and Function.** v. 18, n. 02, p. 167–174, 2004.

SILVA, J. V. **Efeitos do CaCl₂ no crescimento e acumulação de osmorreguladores em plantas de feijão-de-corda cv. Pitiúba estressadas com NaCl.** 1998. 103 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

UCHIDA, A. *et al.* Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, v. 163, n. 03, p. 515-523, 2002.

VAIDYANATHAN, H. *et al.* Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) — differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v. 165, n. 06, p. 1411-1418, 2003.

VEERANAGAMALLAIAH, G. *et al.* 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, n. 02, p. 239-244, 2007.

WAHID, A. *et al.* Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 03, p. 283-294, 2007.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with ninhydrin. **The Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.

Capítulo II

(Artigo publicado na revista Plant Physiology and Biochemistry, v. 56, p. 62-71, 2012)

Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in Maize

Franklin Aragão Gondim^{a,b}, Enéas Gomes-Filho^{a*}, José Hélio Costa^a, Nara Lídia Mendes Alencar^a, José Tarquinio Prisco^a

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal)/CNPq, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6039, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^b Present address: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Av. Contorno Norte, 10, Parque Industrial, CEP: 61925-315, Maracanaú, Ceará, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 9405; fax: +55 85 3366 9829.
E-mail address: egomesf@ufc.br (E. Gomes-Filho).

Abstract

Pretreatment in plants is recognized as a valuable strategy to stimulate plant defenses, leading to better plant development. This study evaluated the effects of H₂O₂ leaf spraying pretreatment on plant growth and investigated the antioxidative mechanisms involved in the response of maize plants to salt stress. It was found that salinity reduced maize seedling growth when compared to control conditions, and H₂O₂ foliar spraying was effective in minimizing this effect. Analysis of the antioxidative enzymes catalase (EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7), ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.1) and superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) revealed that H₂O₂ spraying increased antioxidant enzyme activities. Catalase (CAT) was the most responsive of these enzymes to H₂O₂, with higher activity early (48 h) in the treatment, while guaiacol peroxidase (GPX) and ascorbate peroxidase (APX) were responsive only at later stages (240 h) of treatment. Increased CAT activity appears linked to gene expression regulation. Lower Malondialdehyde levels were detected in plants with higher CAT activity, which may result from the protective function of this enzyme. Overall, we can conclude that pretreatment with H₂O₂ leaf spraying was able to reduce the deleterious effects of salinity on seedling growth and lipid peroxidation. These responses could be attributed to the ability of H₂O₂ to induce antioxidant defenses, especially CAT activity.

Keywords: Acclimation; Antioxidative enzymes; Catalase; Hydrogen peroxide; Malondialdehyde; Oxidative stress; Salt stress; *Zea mays*.

Abbreviations: APX, ascorbate peroxidase; CAT, catalase; DM, dry mass; FM, fresh mass; GPX, guaiacol peroxidase; HAS, hours after spraying; H₂O₂, hydrogen peroxide; MDA, Malondialdehyde; RDM, root dry mass; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SDM, shoot dry mass; SOD, superoxide dismutase.

1. Introduction

Salinity is a major abiotic stress that affects plant growth and limits crop productivity worldwide [1] and occurs on both irrigated and non-irrigated lands. High salt concentrations cause ion imbalance and hyperosmotic stress in plants [2]. The problem has been aggravated by agricultural practices such as irrigation that can cause water tables to rise and concentrate salts in the root zone [3]. Poor quality water for irrigation and poor drainage are the main reasons for increases in soil salinity in irrigated areas [4].

Reactive oxygen species (ROS) production is a normal biochemical event that occurs in plants. The ROS are generated during normal cellular metabolism, but there is evidence that ROS production is increased when plants are subjected to biotic or abiotic stresses [5]. The main ROS production sites are the chloroplasts, mitochondria and peroxisomes [6]. The most commonly produced ROS are singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) and hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) radicals [7,8]. H_2O_2 can also be produced in the cytosol, plasma membrane and extracellular matrix by various oxidases and cell wall peroxidases [9]. ROS, when in excess, can have detrimental effects on plant metabolism, causing oxidative damage to proteins, nucleic acids and lipids essential to membrane structure [10,5].

The harmful effects of ROS in plants can be reduced or eliminated by non-enzymatic and enzymatic defense systems [8]. The non-enzymatic system includes hydrophilic compounds (such as ascorbate and reduced glutathione) and lipophilic compounds (such as tocopherols and carotenoids) capable of quenching ROS [8]. The enzymatic defense system consists of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX) and other enzymes of the ascorbate-glutathione cycle [3,8,11].

The antioxidant enzyme system is recognized as the main mechanism of plant tolerance to environmental stress [12]. Many studies have shown a correlation between salt tolerance and efficient antioxidant systems in tolerant genotypes ([13], in *Triticum aestivum* L.; [1,14], in *Oriza sativa* L.; [12], in *Beta vulgaris*; and [15], in *Zea mays*). Moreover, even in sensitive plants, salinity tolerance has been achieved by pretreatment with H_2O_2 , as demonstrated in monocotyledonous species such as rice [16] and maize [17]. In both studies, H_2O_2 , applied to the root system, was capable of stimulating the antioxidant enzyme system.

Studies have shown that ROS, especially H_2O_2 , play an important role as signaling molecules and are produced and controlled by metabolism, being beneficial at low concentrations and harmful when produced in excess [18,19]. Experiments conducted at low

H_2O_2 cell concentrations in which the plant is challenged by an environmental change have shown that H_2O_2 influences plant growth and development [19].

There are few studies that examine spraying leaves with H_2O_2 . In *Nicotiana tabacum* plants, increased tolerance to oxidative stress generated by high light intensities or catalase inhibitor (aminotriazole) was observed by spraying them with H_2O_2 [20]. In addition, it was proposed that H_2O_2 foliar application contributed to increased antioxidant enzyme activity, decreased lipid peroxidation and chloroplast ultrastructure protection in *Cucumis sativus* [21]. Other strategies of H_2O_2 application have been used such as in seeds [22] and in root system [16,17], however these methods appear less suitable than leaf spraying. In seeds, H_2O_2 would be applied a single time before germination, whilst application to the root system requires the plants to be grown hydroponically and thus is not suitable for plants cultivated in soil. In this context, leaf spraying is a simpler system of H_2O_2 application, useful in different stages of plant development, and is inexpensive and easy to use by farmers. Therefore, the hypothesis of this study is that H_2O_2 leaf spray is an effective method to induce the antioxidative enzymatic system and minimizes the deleterious effects of salinity on maize plant growth.

In order to gain insight on H_2O_2 leaf spraying and its relationship with salt tolerance, the aim of this study was to evaluate the effects of H_2O_2 leaf spraying on growth, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in maize plants under salt stress.

2. Results

2.1. Effect of H_2O_2 leaf spraying on plant growth under salt stress

The effect of 10 mM H_2O_2 leaf spraying on plant growth under salt stress was investigated through shoot and root dry mass analyses in the following plant treatments: water/control, H_2O_2 /control, water/salt-stressed and H_2O_2 /salt-stressed (Fig. 1 and Fig. 2). In shoot dry mass (SDM) analyses (Fig. 1A), at 48 hours after spraying (HAS), the SDM in the H_2O_2 /control plants was *ca.* 23% higher than in the water/control plants. At 96 HAS no significant differences were observed in SDM between treatments. However, at 240 HAS, SDM was *ca.* 21% higher in the H_2O_2 /control plants compared to the water/control plants, while in the water/salt-stressed and H_2O_2 /salt-stressed plants, the SDM was *ca.* 61% and 31% lower than that of the water/control plants, respectively. At 240 HAS, SDM in H_2O_2 /salt-stressed plants was *ca.* 22% higher than in water/salt-stressed plants. In the root dry mass (RDM) (Fig. 1B), it was found that major differences also occurred at 240 HAS, but a

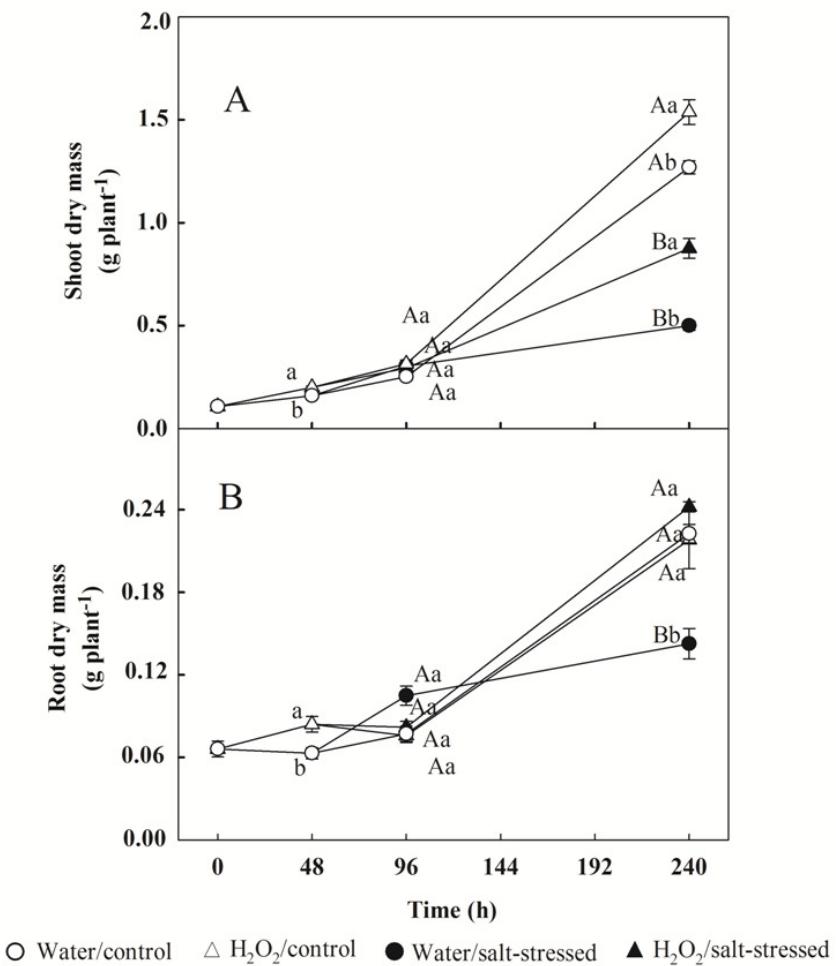


Fig. 1. Shoot (A) and root (B) dry masses of maize plants at 0 (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying. The plants were submitted to four treatments: 1. sprayed with distilled water and not salt-stressed (water/control), 2. sprayed with H₂O₂ solution and not salt-stressed (H₂O₂/control), 3. sprayed with distilled water and salt-stressed (water/salt-stressed), and 4. sprayed with H₂O₂ solution and salt-stressed (H₂O₂/salt-stressed). The leaf spraying was carried out after the first harvest (0 h) and repeated after 24 h. Salt was added at 48 and 72 hours after spraying (HAS). Each value corresponds to the mean \pm standard error of five replicates. In the same harvest time values followed by the same capital letter or small letter are not statistically different for NaCl and H₂O₂ treatments, respectively, according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

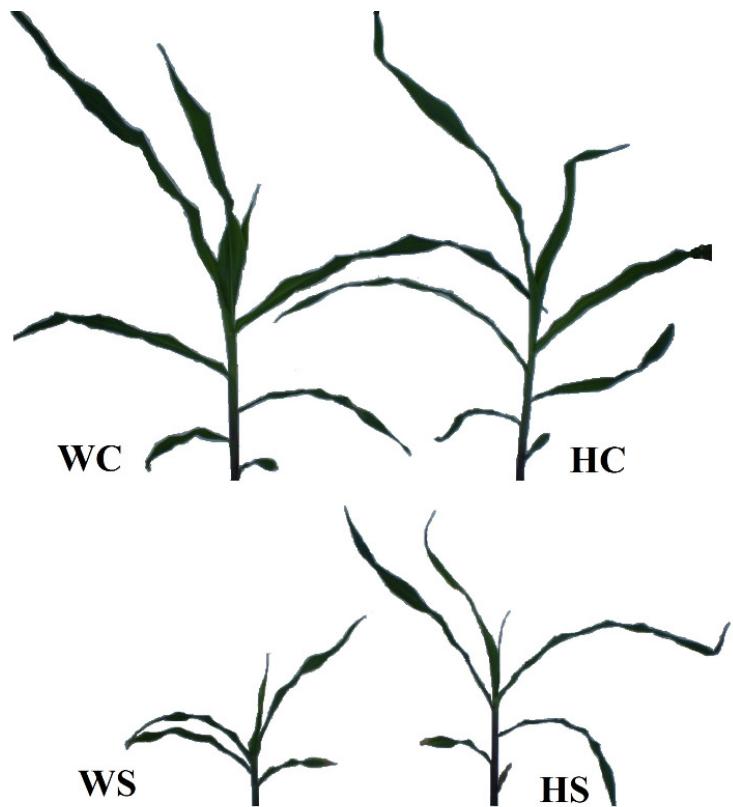


Fig. 2. Maize plants under different treatments at 240 hours after leaf spraying: water/control plants (WC); H_2O_2 /control plants (HC); water/salt-stressed plants (WS); and H_2O_2 /salt-stressed plants (HS).

peculiar behavior, compared to SDM, was observed. The RDM was similar in the H₂O₂/control, water/control and H₂O₂/salt-stressed plants, but it was *ca.* 36% lower in the water/salt-stressed plants in relation to the water/control plants. Moreover, at 240 HAS, RDM in H₂O₂/salt-stressed plants was *ca.* 69% higher than in water/salt-stressed plants.

Fig. 2 shows photographs of plants at 240 HAS. The water/salt-stressed plants presented reduced growth compared to the water/control plants, but the H₂O₂/salt-stressed plants grew more than the water/salt-stressed plants.

2.2. Antioxidative enzyme activities and their isoenzymes

The CAT, GPX, APX and SOD antioxidant enzyme activities were studied by spectrophotometric and polyacrylamide gel analyses. The polyacrylamide gel analyses were also used to detect different isoenzymes.

CAT activity revealed by spectrophotometric assay is shown in Fig. 3A. At 48 HAS, the CAT activity in the H₂O₂/control plants was *ca.* 32% higher than in the water/control plants. At 96 and 240 HAS, the H₂O₂/control plants showed CAT activity values *ca.* 45% and 29% higher, respectively, than in the water/control plants. Additionally, the water/salt-stressed plants showed pronounced reductions in the CAT activity. The CAT activity in the water/salt-stressed plants was *ca.* 39% and 33% lower than the water/control plants at 96 and 240 HAS, respectively. However, in the H₂O₂/salt-stressed plants, the CAT activities were *ca.* 18% and 19% higher than in the water/control plants at 96 and 240 HAS, respectively. Additionally, at 96 and 240 HAS, CAT activity in H₂O₂/salt-stressed plants was *ca.* 92% and 75% higher than in water/salt-stressed plants, respectively (Fig. 3A).

The CAT activity in polyacrylamide gel (Fig. 3B) revealed a similar pattern to the spectrophotometric analysis. In addition, two isoenzymes, here named CAT I and CAT II, were detected. CAT II presented with more intense bands and was detected in all of the tested conditions, while CAT I was visibly detected in the H₂O₂/control plants at 96 and 240 HAS.

GPX activity revealed by spectrophotometric assay is shown in Fig. 4A. Significant differences in GPX activities were found at 48, 96 and 240 HAS. At 48 and 96 HAS, GPX activity was *ca.* 16 and 14% higher in the H₂O₂/control plants compared to the water/control plants, respectively. At 240 HAS, the higher GPX activity was found in the H₂O₂/salt-stressed plants. It should be also observed that the GPX activity at 240 HAS was *ca.* 44% higher in the H₂O₂/control plants and *ca.* 58% and 83% higher in the water/salt-stressed and H₂O₂/salt-

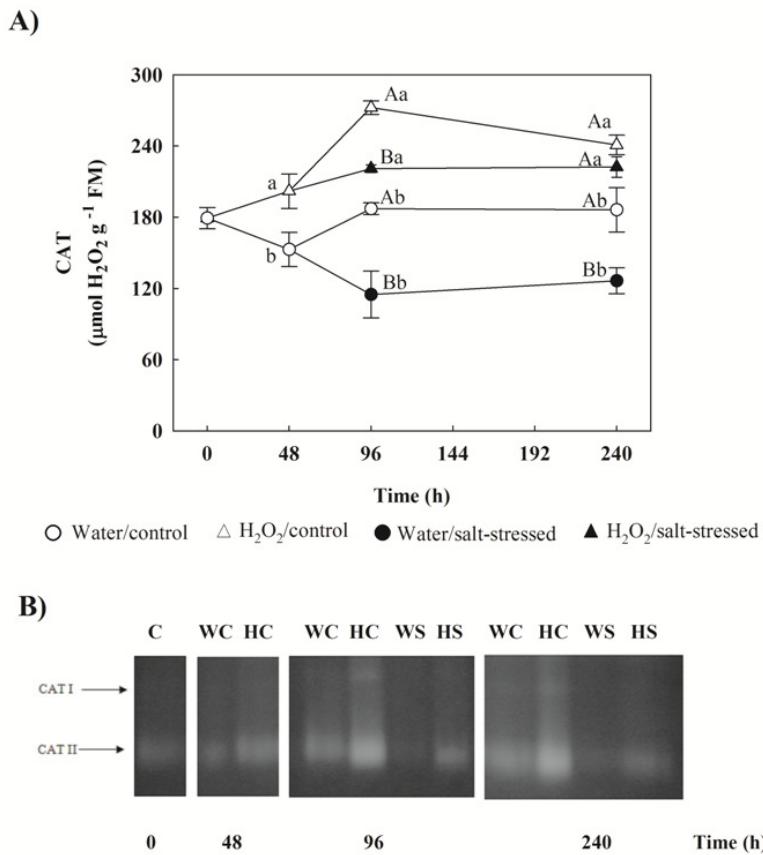


Fig. 3. CAT activities determined by spectrophotometric (A) and polyacrylamide gel analyses (B) in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying. Each value corresponds to the mean \pm standard error of five replicates. In the same harvest time values followed by the same capital letter or small letter are not statistically different for NaCl and H₂O₂ treatments, respectively, according to Tukey's test ($P \leq 0.05$) (A). The columns correspond to control (C), water/control (WC), H₂O₂/control (HC), water/salt-stressed (WS) and H₂O₂/salt-stressed (HS) plants. A total of 20 μ g of protein were loaded in each lane (B).

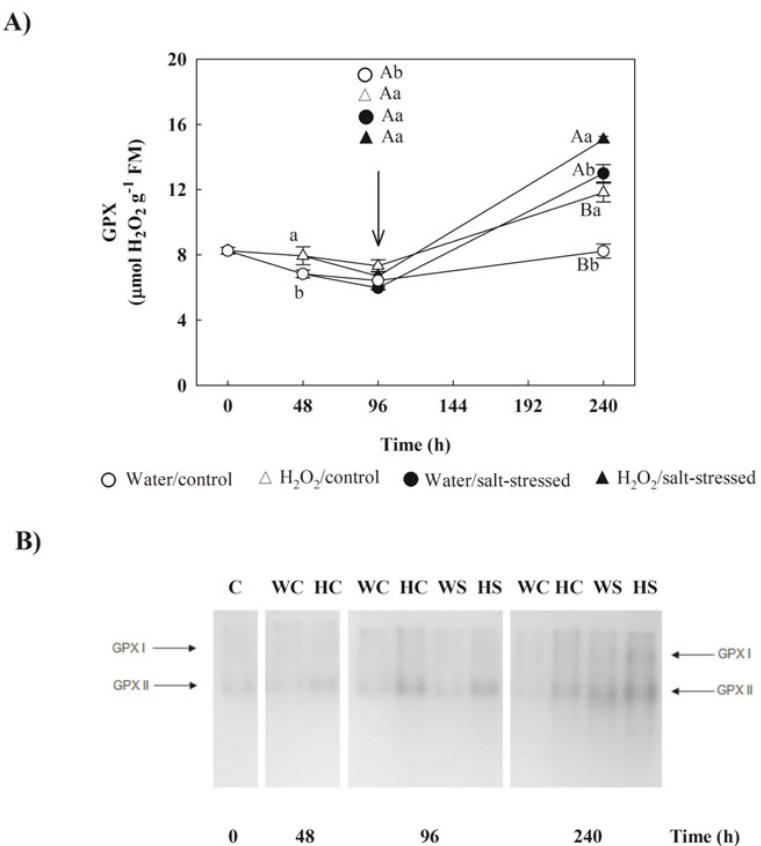


Fig. 4. GPX activities determined by spectrophotometric (A) and polyacrylamide gel analyses (B) in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying. Each value corresponds to the mean \pm standard error of five replicates. In the same harvest time values followed by the same capital letter or small letter are not statistically different for NaCl and H₂O₂ treatments, respectively, according to Tukey's test ($P \leq 0.05$) (A). The columns corresponded to control (C), water/control (WC), H₂O₂/control (HC), water/salt-stressed (WS) and H₂O₂/salt-stressed (HS) plants. A total of 20 μ g of protein were loaded in each lane (B).

stressed plants compared to the water/control plants, respectively. Additionally, GPX activity in H₂O₂/salt-stressed plants was *ca.* 16% higher than in water/salt-stressed plants.

The GPX activity in polyacrylamide gel revealed similar patterns to the spectrophotometric analysis (Fig. 4B), and two isoenzymes, here named GPX I and II, were detected. The GPX II bands were more intense than GPX I.

The APX activity was higher at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying) compared to other plants/conditions at 48, 96 and 240 HAS (Fig. 5). The differences in APX activity were found between the treatments at 96 and 240 HAS. At 96 HAS, the APX activity was *ca.* 35% higher in the H₂O₂/control plants and *ca.* 28% lower in the water/salt-stressed compared to the water/control plants. No difference in the APX activity was observed between the H₂O₂/salt-stressed and water/control plants. At 240 HAS, the APX activity in the H₂O₂/control plants was similar to that of the water/control plants. The APX activity was *ca.* 18% lower in the water/salt-stressed plants and *ca.* 40% higher in the H₂O₂/salt-stressed plants compared to the water/control plants at 240 HAS. Additionally, at 96 and 240 HAS, APX activity in H₂O₂/salt-stressed plants was *ca.* 37% and 69% higher than in water/salt-stressed plants, respectively.

The APX activity in gel revealed a similar pattern to the spectrophotometric analysis (Fig. 5B). Four APX isoenzymes were detected at 0 HAS, here named APX I to IV. APX IV was predominant at all times and plant conditions. APX I was mainly detected at 96 HAS in the H₂O₂/control plants at similar levels to APX IV. APX II and III were only detected at 0 h.

In general, the H₂O₂ leaf spraying caused some SOD activity changes (Fig. 6). At 48 HAS, the H₂O₂/control plants showed SOD activity *ca.* 15% higher than the water/control plants. At 96 HAS, no significant differences were observed in SOD activity between water/control plants and H₂O₂/control plants, nevertheless, the SOD activity was *ca.* 10% higher in the H₂O₂/salt-stressed plants compared to the water/salt-stressed plants. At 240 HAS, the SOD activity was *ca.* 20% higher in the H₂O₂/control plants and *ca.* 33% higher in the H₂O₂/salt-stressed plants compared to the water/control plants. No differences were observed in the water/salt-stressed plants compared to the water/control plants. Additionally, at 240 HAS, SOD activity in H₂O₂/salt-stressed plants was *ca.* 19% higher than in water/salt-stressed plants.

The SOD activity in gel revealed a similar pattern to the results observed in spectrophotometric analysis. One SOD isoenzyme was detected (Fig. 6B).

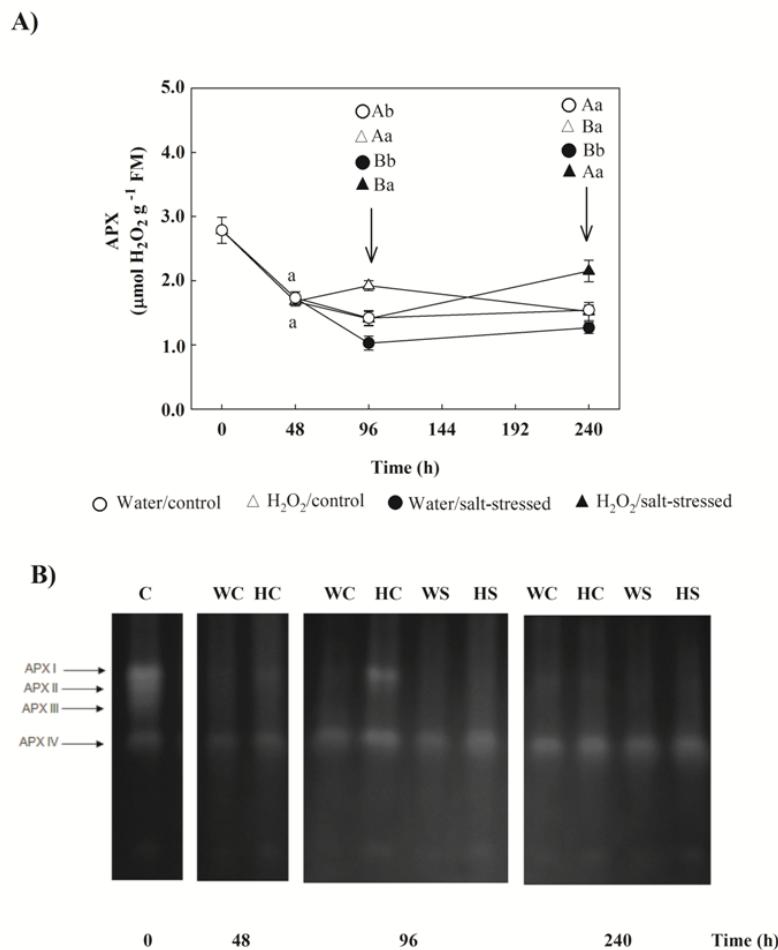


Fig. 5. APX activities determined by spectrophotometric (A) and polyacrylamide gel analyses (B) in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying. Each value corresponds to the mean \pm standard error of five replicates. In the same harvest time values followed by the same capital letter or small letter are not statistically different for NaCl and H₂O₂ treatments, respectively, according to Tukey's test ($P \leq 0.05$) (A). The columns corresponded to control (C), water/control (WC), H₂O₂/control (HC), water/salt-stressed (WS) and H₂O₂/salt-stressed (HS) plants. A total of 50 μ g of protein were loaded in each lane (B).

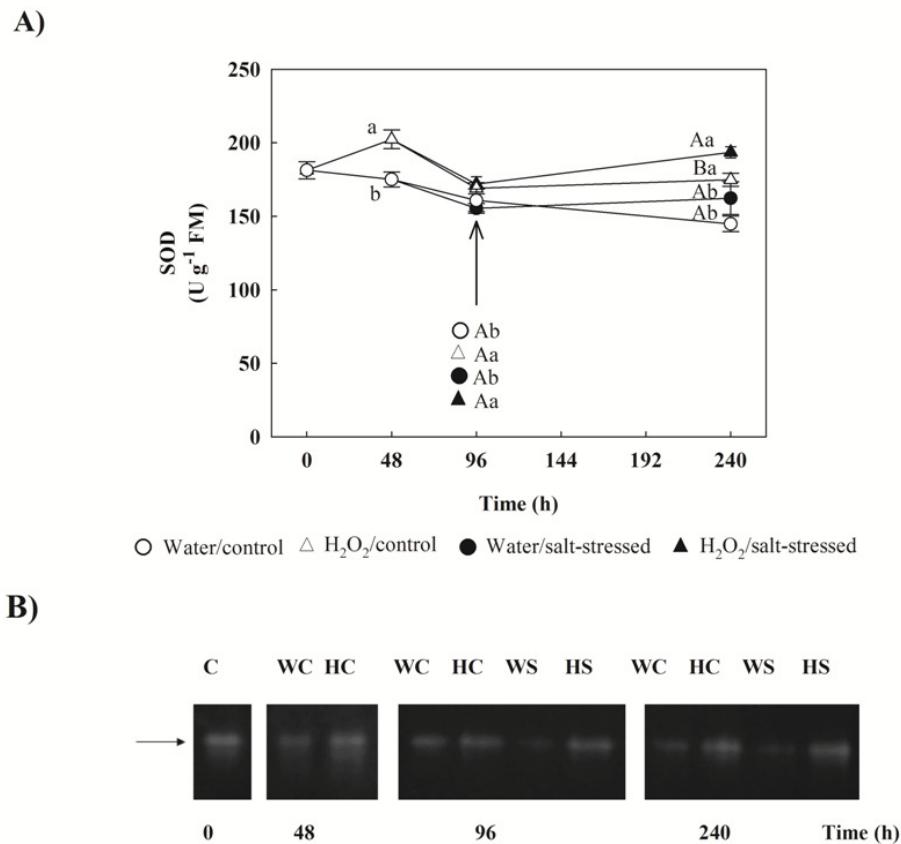


Fig. 6. SOD activities determined by spectrophotometric (A) and polyacrylamide gel analyses (B) in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying. Each value corresponds to the mean \pm standard error of five replicates. In the same harvest time values followed by the same capital letter or small letter are not statistically different for NaCl and H₂O₂ treatments, respectively, according to Tukey's test ($P \leq 0.05$) (A). The columns corresponded to control (C), water/control (WC), H₂O₂/control (HC), water/salt-stressed (WS) and H₂O₂/salt-stressed (HS) plants. A total of 20 μ g of protein were loaded in each lane (B).

2.3. Effect of H₂O₂ leaf spraying on malondialdehyde content

The H₂O₂ leaf spraying decreased the malondialdehyde (MDA) levels (Fig. 7). At 48 HAS, the MDA content in the H₂O₂/control plants was *ca.* 28% lower than in the water/control plants. At 96 and 240 HAS, the H₂O₂/control plants had values *ca.* 21% and 17%, respectively, lower than the water/control plants. Salinity increased the MDA content *ca.* 19% and 26% in the water/salt-stressed plants at 96 and 240 HAS, respectively, compared to the water/control plants. No change was observed in the H₂O₂/salt-stressed plants compared to the water/control plants. In addition, at 96 and 240 HAS, MDA content in H₂O₂/salt-stressed plants was *ca.* 17% and 18% lower than in water/salt-stressed plants, respectively.

2.4. Effect of H₂O₂ leaf spraying on the CAT transcript level

The transcript levels of the CAT genes were analyzed by RT-PCR using degenerate primers at 0, 12, 24, 36, 48, 60, 96 and 240 HAS (Fig. 8). Amplification of Ef1 α cDNA was used as an internal control for the RT-PCR assays.

The CAT transcript levels were significantly higher in the H₂O₂ leaf sprayed plants compared to the water leaf sprayed plants mainly at 36, 48 and 60 HAS (Fig. 8A and Fig. 8B). However, these transcripts were reduced at 96 and 240 HAS with salinity treatment.

3. Discussion

In this study, we found that salinity reduced plant growth compared to the control conditions, and H₂O₂ leaf spraying was effective at minimizing this effect (Fig. 1 and Fig. 2). The beneficial effect of H₂O₂ leaf spraying on plant growth was most evident at 240 HAS.

Other studies have shown the beneficial effect of H₂O₂ in monocots under saline conditions using different H₂O₂ application methods. In maize, H₂O₂ pretreatment applied to the root system [17] and on seeds [22] was able to confer salt tolerance. In wheat, H₂O₂ pretreatment carried out on seeds [23] was also able to confer salt tolerance. Here, we studied the alternative application method of spraying leaves. This method could be useful in different stages of plant development and provides another option to farmers.

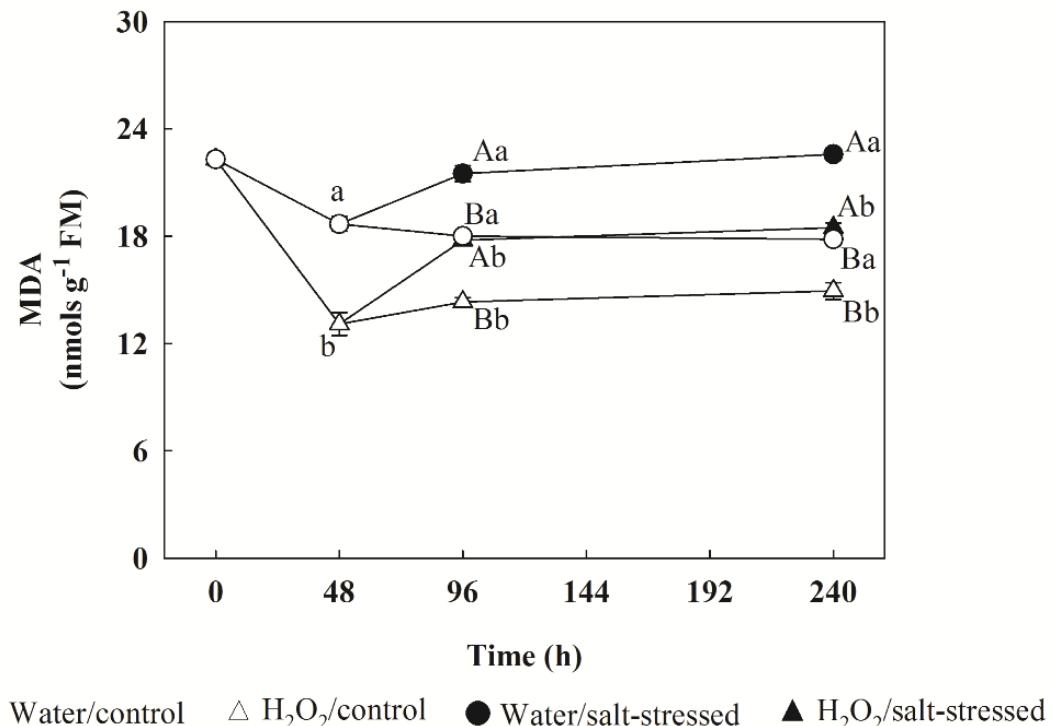


Fig. 7. MDA content in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 48, 96 and 240 hours after leaf spraying under the following treatments: water/control, H_2O_2 /control, water/salt-stressed and H_2O_2 /salt-stressed. Each value corresponds to the mean \pm standard error of five replicates. In the same harvest time values followed by the same capital letter or small letter are not statistically different for NaCl and H_2O_2 treatments, respectively, according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

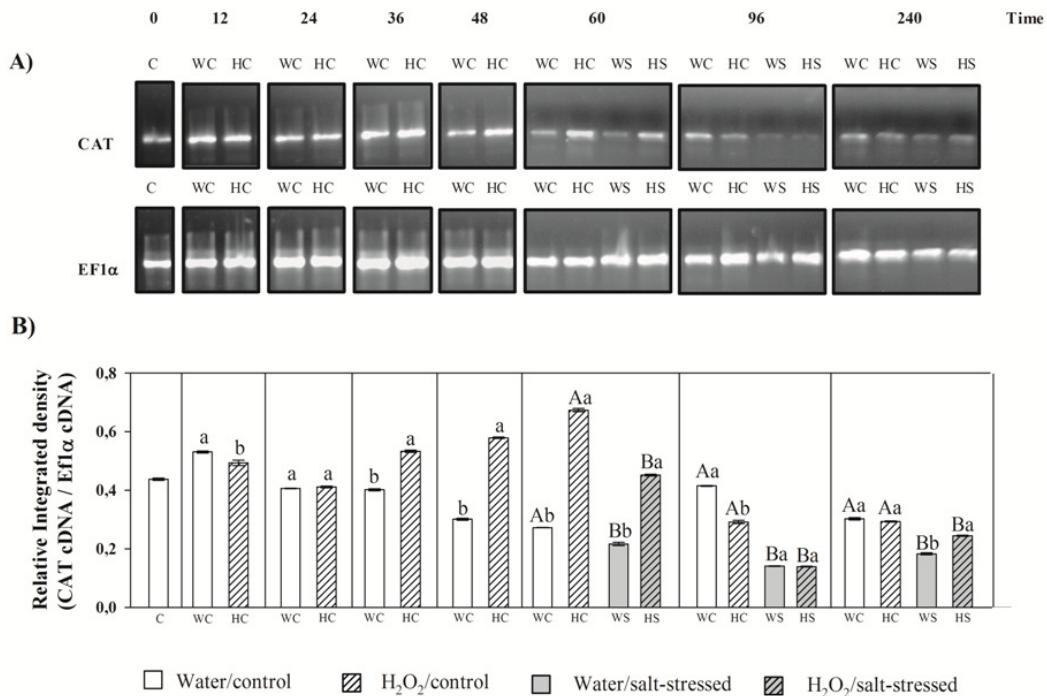


Fig. 8. Transcript levels of CAT in maize leaves at 0 h (initial time of plant harvest - just before spraying), 12, 24, 36, 48, 60, 96 and 240 hours after leaf spraying under control and salinity conditions. (A): RT-PCR products of CAT and EF1 α on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. (B): Normalization of the quantity of CAT transcripts through a ratio of integrated densities of the CAT cDNA and EF1 α elongation factor cDNA bands. The samples are identified as control (C), water/control (WC), H₂O₂/control (HC), water/salt-stressed (WS), and H₂O₂/salt-stressed (HS). Each value corresponds to the mean \pm standard error of three independent RT and PCR reactions/gels from one set of total RNA. In the same harvest time values followed by the same capital letter or small letter are not statistically different for NaCl and H₂O₂ treatments, respectively, according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

There are some studies on H_2O_2 leaf spraying in plants and its relationship with tolerance to stresses. For example, Gechev et al. [20] studied tobacco plants and detected tolerance to oxidative stress caused by high light intensities and a CAT inhibitor. Gao et al. [21] observed heat stress tolerance in cucumber plants. At the time of writing this, a search of the literature revealed no study of H_2O_2 leaf spraying in plants and its relationship with salt tolerance.

Our results showed that H_2O_2 leaf spraying was capable of stimulating the antioxidant enzyme system and to confer salt tolerance in maize plants. Other studies have shown that increased activity of ROS scavenging enzymes is related to stress tolerance. Similarly to our study, Azevedo Neto et al. [17] showed that the H_2O_2 pretreated root system in maize plants conferred salt tolerance. Gechev et al. [20] observed that oxidative stress tolerance was related to increases in CAT, APX and GPX activities when H_2O_2 was applied to leaves. Also, Xu et al. [24] correlated the aluminum tolerance in wheat plants with H_2O_2 root system pretreatment that resulted in increased antioxidant enzyme activities.

In the present study, CAT was the main enzyme responsible for H_2O_2 scavenging in both the H_2O_2 /control and H_2O_2 /salt-stressed plants compared to the water/control and water/salt-stressed plants, respectively (Fig. 3). As related to H_2O_2 elimination rates, the CAT activities were on average 21 and 99 times higher than GPX and APX activities, respectively (Fig. 3, Fig. 4 and Fig. 5). CAT is notably distinguished from the other enzymes by not requiring a reductant when scavenging H_2O_2 [25]. In addition, CAT is distinguished from many other peroxide-metabolizing enzymes by its high specificity for H_2O_2 and weak activity against organic peroxides [25].

Under salinity conditions, it has been shown that CAT activity decreases, potentially due to the prevention of new enzyme synthesis [26]. Similarly, in this study, the CAT activity was reduced under saline conditions in non- H_2O_2 treated plants (Fig. 3). However, it increases when the plants were previously treated with H_2O_2 (Fig. 3). This behavior appears to involve CAT gene regulation because the CAT transcript levels were increased in the H_2O_2 treated plants mainly at 36, 48 and 60 HAS and were reduced with prolonged salinity exposure (96 and 240 HAS) (Fig. 8A). Therefore, we found that H_2O_2 leaf spraying augmented the CAT activity as well as the CAT transcripts becoming the plant more prepared to a subsequent salinity exposure.

According to our findings, GPX appeared to have a regulatory or secondary function in H_2O_2 scavenging because its ability to eliminate ROS was significantly lower than that of

CAT (Fig. 3 and Fig. 4). The ability of H₂O₂ leaf spraying to increase GPX activity was only evident at later stages (240 HAS). This increase is related to two GPX isoenzymes (Fig. 4B) whose intensities increased with salinity and H₂O₂ exposure. GPX is found as different isoenzymes distributed in different plant tissues [27,28]. In addition, it has been observed that different isoenzymes are involved in the response to salinity [29].

APX also seems to play a secondary role in H₂O₂ scavenging because it presented the lowest rate of H₂O₂ elimination compared to CAT and GPX (Fig. 3, Fig. 4 and Fig. 5). However, a peculiar behavior was found. Contrary to GPX and CAT, the APX activity was highest at 0 HAS (initial time of plant harvest - just before spraying) and then decreased. This behavior appears to be linked to plant development stage because this activity was observed in all plants. In addition, the decrease is accompanied by the disappearance of two of the four APX isoenzymes (Fig. 5B). Similar to GPX, an increase in the APX response with H₂O₂ leaf spray pretreatment under salinity was observed only in later stages (240 HAS) (Fig. 5A).

We also investigated the SOD activity. It is known that salinity generates ROS, including superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) [5], and SOD eliminates $\cdot\text{O}_2^-$ by forming H₂O₂. Subsequently, this H₂O₂ can be removed by CAT, GPX and APX [30]. Here, it was found that H₂O₂ leaf spraying, especially at 48 h, and H₂O₂/salinity at 240 HAS increased SOD activity (Fig. 6). These findings corroborate with the observation that H₂O₂ may induce the synthesis of or activate transcription factors related to the induction of several antioxidative enzymes, among them SOD [31]. The SOD activity appeared related to a single isoenzyme (Fig. 6B), in contrast to the fact that overall SOD activity is related to several isoenzymes [32,33].

The accumulation of MDA, a membrane lipid peroxidation product in plants exposed to adverse environmental conditions, was evaluated as a reliable indicator of free radical formation in tissues. It has been used as a good indicator of the severity of injury caused to cells during oxidative stress [13,29]. Our results showed that the water/salt-stressed plants accumulated MDA to higher levels than the H₂O₂/salt-stressed plants (Fig. 7). The highest MDA levels were found in plants that had lower CAT activity and vice-versa, demonstrating the protective function of this enzyme. The protective effect of the antioxidant enzyme system to prevent MDA accumulation was also observed by [34] in *Centaurea tuzgoluensis* under saline conditions. The authors observed little MDA accumulation under the saline conditions, attributing the phenomenon to the presence of an efficient antioxidant enzyme system. Furthermore, Gao et al. [21] found that H₂O₂ applied to leaves increased antioxidant enzyme

activities, decreased lipid peroxidation and protected the chloroplast ultrastructure in *Cucumis sativus* plants under heat stress.

In conclusion, it was found that H₂O₂ leaf spray (10 mM) pretreatment for 2 days reduced the deleterious effects of salinity on maize plant growth. This effect could be attributed to the ability of H₂O₂ to induce the antioxidant defense system, especially CAT activity, which was the main H₂O₂ scavenging enzyme. Lowest MDA levels were found in the plants that had the highest CAT activity and vice-versa.

4. Materials and Methods

4.1. Plant material and experimental conditions

Hybrid triple BRS 3003 Maize seeds (*Zea mays* L.) were provided by Laboratório de Sementes, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. The experiment was carried out under greenhouse conditions (3°44'S; 38°33'W, at sea level) with a mean temperature of 28.5 °C, a 63.9% mean air relative humidity and a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 1500 µmol m⁻² s⁻¹ (at noon).

Seeds were surface-sterilized with 0.7% sodium hypochlorite solution and rinsed with distilled water. Afterwards, the seeds were sown in vermiculite moistened with distilled water and irrigated daily. Five days after sowing, the seedlings were transferred to plastic trays containing 10 L of half-strength Hoagland's nutrient solution [35] (hydroponic culture) and were acclimated for two days. The hydroponic cultures were aerated continuously with an air bubbler. The nutrient solution was renewed weekly.

Eight days after sowing, the seedlings were sprayed with distilled water (control) or 10 mM H₂O₂ solution (containing the detergent 0.025% Tween 20 to reduce surface tension and facilitate penetration). Three preliminary experiments using different H₂O₂ concentrations (1, 10, 50 and 100 mM) were carried out in order to find the optimal H₂O₂ concentration of 10 mM and confirm the obtained results. The plants were sprayed with 15 ml H₂O₂ or distilled water per plant at 6:30 am and again after 24 h. At 48 hours after the first spray, the seedlings were treated with 80 mM NaCl (salt was added 40 mM day⁻¹ to avoid osmotic shock). The plants were submitted to four treatments: 1. sprayed with distilled water and non salt-stressed (water/control), 2. sprayed with H₂O₂ solution and non salt-stressed (H₂O₂/control), 3. sprayed with distilled water and salt-stressed (water/salt-stressed), and 4. sprayed with H₂O₂ solution and salt-stressed (H₂O₂/salt-stressed).

Four harvests were performed to measure plant growth, enzyme activities, isoenzymes and lipid peroxidation. The first harvest was eight days after sowing and before the first spray; the second harvest was at 48 h after spraying onset and before salt addition; the third harvest was at 96 h after the spraying began, when the plants were subjected to saline conditions (1 day to 80 mM NaCl); and the fourth harvest was at 240 h after the start of spraying (6 days 80 mM NaCl).

Catalase (CAT) gene expression was performed using the elongation factor 1 alpha (Ef1 α) as reference gene at eight periods: at 0 h (initial time of plant harvest – just before spraying) and at 12, 24, 36, 48, 60, 96 and 240 hours after spraying.

All experiments were performed with five replicates (each replicate represented the mean of two plants), and the data were expressed as the means \pm standard error. The experimental design was completely randomized. The values were compared applying the same harvest time. At 48 HAS, the data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) corresponding to two treatments (two H₂O₂ levels) and five replicates. At 96 and 240 HAS, the data were analyzed using a two-way ANOVA with four treatments (two NaCl levels \times two H₂O₂ levels) and five replicates. In the same harvest time, values followed by the same capital letter are not statistically different for NaCl (water/control compared to water salt-stressed; H₂O₂/control compared to H₂O₂/salt-stressed). In the same harvest time, values followed by the same small letter are not statistically different for H₂O₂ treatments (water/control compared to H₂O₂/control; water/salt-stressed compared to H₂O₂/salt-stressed). The means were compared through Tukey's test ($P \leq 0.05$).

4.2. Harvests and growth measurements

During the harvests, seedlings from each treatment were separated into three distinct groups. In the first group of plants, only the first fully expanded leaf was used, which was frozen in liquid nitrogen and stored frozen (-25 °C) for biochemical analyses. In the second group, the plants were harvested, the shoot (leaves and stem) and roots separated and then dried in a forced air circulation oven at 60 °C for 48 h to provide the shoot dry mass (SDM) and root dry mass (RDM). In the third group, the seedlings were used for analysis of gene expression (RT-PCR). In this analysis, the first fully expanded leaf was harvested, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

4.3. Extract preparation for enzyme assays, isoenzyme analysis and lipid peroxidation

Leaf tissue (1 g) was homogenized in a mortar and pestle with 4 mL of ice-cold extraction buffer (100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.1 mM EDTA). For APX estimation, 2 mM ascorbic acid was added to the extraction buffer. The homogenate was filtered through muslin cloth and centrifuged at 12,000 g for 15 min. The supernatant fraction was used as crude extract for enzyme activity determination by spectrophotometric and polyacrylamide gel analyses and for lipid peroxidation determination. All operations were performed at 4 °C.

4.4. Enzyme assays

Total SOD (EC 1.15.1.1) activity was determined by measuring its ability to inhibit the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium chloride (NBT), as described previously by Giannopolitis and Ries [36]. The reaction was conducted at 25 °C in an illuminated chamber with two 20 W fluorescent tubes for 15 min. One SOD activity unit (U) was defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of the NBT photoreduction rate, and the results were expressed as U mg⁻¹ of fresh mass (FM). Total CAT (EC 1.11.1.6) activity was measured according to Beers and Sizer [37], with minor modifications. The H₂O₂ decrease by H₂O₂ breakdown was determined measuring the absorbance at 240 nm and using the molar extinction coefficient (36 M⁻¹ cm⁻¹). Total APX (EC 1.11.1.1) activity was assayed according to Nakano and Asada [38]. The oxidation of ascorbate was determined measuring absorbance at 290 nm and using molar extinction coefficient (2.8 mM⁻¹ cm⁻¹). Total GPX (EC 1.11.1.7) activity was determined as described by Urbanek et al. [39]. The guaiacol oxidation was determined measuring the absorbance at 470 nm and using the molar extinction coefficient (26.6 mM⁻¹ cm⁻¹). For CAT, APX and GPX, the results were expressed as µmol H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ FM.

4.5. Isoenzyme analysis

Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed in 7% (APX and CAT), 7.5% (GPX) or 10% (SOD) polyacrylamide, according to Davis [40]. The electrophoresis was done in vertical slab gel using the miniVE electrophoresis system

(Amersham Biosciences, Sweden) at 4 °C and 150 V for approximately 2 h. Samples were mixed with 10% glycerol (v/v) and 0.25% bromophenol blue before loading onto the gels. For each lane, 20, 50, 45, and 30 µg of leaf protein extract was applied to CAT, APX, GPX and SOD, respectively. The carrier buffer was composed of 25 mM Tris-HCl, pH 8.3 and 250 mM glycine, and the gel was pre-run for 30 min before the leaf extract were loaded; for APX, 2 mM ascorbate was added to the buffer. The isoenzymes were designated based on their order of migration. The electrophoresis analyses were representative of three independent replicates.

CAT activity was determined according to Woodbury et al. [41]. CAT was negatively stained on a green background.

APX activity was detected as described by Mittler and Zilinskas [42], with minor modifications. Gels were washed twice with 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 2 mM ascorbate. Next, the gel was incubated in the same buffer with 4 mM ascorbate and 1 mM H₂O₂ for 20 min. The gel was rinsed with distilled water and stained in a solution containing 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), 28 mM tetramethylethylenediamine (TEMED) and 3 mM NBT for 10 min. APX stained negatively on a purple background.

GPX activity was detected according to Fielding and Hall [43] with minor modifications. Gels were incubated in 25 mM phosphate buffer (pH 7.0) for 15 min. Then, the gel was stained in a solution containing 25 mM phosphate buffer (pH 7.0), 18 mM guaiacol and 25 mM H₂O₂ until reddish brown bands appeared on the gel. The reaction was stopped by immersing the gel in 7% acetic acid.

SOD activity was detected as described by Beauchamp and Fridovich [44]. The gels were exposed under two 20 W fluorescent tubes, and the SOD bands were observed as white bands on a blue background.

4.6. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by measuring the amount of malondialdehyde (MDA) produced by the thiobarbituric acid (TBA) reaction according to Buege and Aust [45]. The MDA content was expressed as nmol MDA g⁻¹ FM calculated using the extinction coefficient $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.7. Total RNA extraction and RT-PCR

For total RNA extraction, the leaf material (100 mg) was homogenized with liquid nitrogen in a mortar and pestle, and a commercial kit was used according to the manufacturer's recommendations (RNeasy plant mini kit, Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA extract was treated with RNase-free DNase I (Promega). Total RNA (2 µg) from each sample was heated at 65 °C for 5 min, cooled on ice for 2 min and transcribed into cDNA by reverse transcription. CAT primers were designed from conserved regions of the *Cat1*, *Cat2* and *Cat3* genes of *Zea mays*. Amplification of elongation factor 1 alpha (Ef1α) was used as a control for each PCR experiment. The Ef1α primers were designed from conserved regions of Ef1α cDNAs obtained from EST data of sorghum, cowpea and cotton. The expected amplified cDNA fragments were 809 and 813 bp in length for *Cat* and *Ef1α*, respectively. PCR assays were carried out according to Costa et al. [46] to semi-quantitatively estimate transcript levels. The optimal annealing temperature of the primers was determined to be 55 °C for both genes. Amplification of both genes was performed by 31 PCR cycles.

The primer sequences were as follows:

CAT sense: 5' GTSAAGTTCTACACCMGVGAG 3' and antisense: 5' GGGWAGTAATYSACCTCYTCG 3';
 Ef1α sense: 5' AGRTTYGAGAARGARGCTGC 3' and antisense: 5' CCACGCTTSAGATCCTTVAC 3'.

The RT-PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide. The images were captured using a system from Labortechnik, Germany. The analyses were representative of three independent RT and PCR experiments from each set of total RNA. The image analysis was employed to normalize the expression level of CAT cDNA against the reference gene Ef1α cDNA data. The densities of the bands were analysed with Scion Image, Release beta 3b software (Scion Corporation, USA). Statistical analysis was performed as described previously.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and a scholarship for F.A. Gondim during his PhD studies.

References

- [1] H. Vaidyanathan, P. Sivakumar, R. Chakrabarty, G. Thomas, Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) – differential response in salt-tolerant and sensitive varieties, *Plant Sci.* 165 (2003) 1411-1418.
- [2] J.-K. Zhu, Plant salt tolerance, *Trends Plant Sci.* 6 (2001) 66-71.
- [3] R. Munns, M. Tester, Mechanisms of Salinity Tolerance, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008) 651-681.
- [4] V. Chinnusamy, A. Jagendorf, J.-K. Zhu, Understanding and improving salt tolerance in plants, *Crop Sci.* 45 (2005) 437-448.
- [5] M.I. Møller, P.E. Jensen, A. Hansson, Oxidative modifications to cellular components in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 58 (2007) 459-481.
- [6] G. Miller, N. Suzuki, S. Ciftci-yilmaz, R. Mittler, Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, *Plant Cell Environ.* 33 (2010) 453-467.
- [7] K. Apel, H. Hirt, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (2004) 373-399.
- [8] A.D. Azevedo Neto, E. Gomes-Filho, J.T. Prisco, Salinity and oxidative stress, in: N.A. Khan, S. Sarvajeet (Eds.), *Abiotic Stress and Plant Responses*. IK International, New Delhi, 2008, pp. 58-82.
- [9] I. Ślesak, M. Libik, B. Karpinska, S. Karpinski, Z. Miszalski, The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses, *Acta Biochim. Pol.* 54 (2007) 39-50.
- [10] G. Noctor, C.H. Foyer, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 249-279.
- [11] M.P. Apse, E. Blumwald, Engineering salt tolerance in plants, *Curr. Opin. Biotech.* 13 (2002) 146-150.
- [12] M. Bor, F. Özdemir, I. Türkan, 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 Sci.* 164 (2003) 77-84.
- [13] R.K. Sairam, K.V. Rao, G.C. Srivastava, Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration, *Plant Sci.* 163 (2002) 1037-1046.

- [14] T. Demiral, I. Türkan, Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance, *Environ. Exp. Bot.* 53 (2005) 247-257.
- [15] A.D. Azevedo Neto, J.T. Prisco, J. Enéas filho, C.E.B. Abreu, E. Gomes-Filho, Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes, *Environ. Exp. Bot.* 56 (2006) 87-94.
- [16] A. Uchida, A.T. Jagendorf, T. Hibino, T. Takabe, T. Takabe, Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice, *Plant Sci.* 163 (2002) 515–23.
- [17] A.D. Azevedo Neto, J.T. Prisco, J. Enéas-Filho, J.R. Medeiros, E. Gomes-Filho, Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants, *J. Plant Physiol.* 162 (2005) 1114-1122.
- [18] T.S. Gechev, J. Hille, Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death, *J Cell Biol.* 168 (2005) 17–20.
- [19] L. Quan, B. Zhang, W. Shi, H. Li, Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network, *J. Integr Plant. Biol.* 50 (2008) 2–18.
- [20] T.S. Gechev, I. Gadjev, F. Van Breusegem, D. Inzé, S. Dukiandjiev, V. Toneva, I. Minkov, Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 708–714.
- [21] Y. Gao, Y. Guo, S. Lin, Y. Fang, J. Bai, Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves, *Sci. Hort.* 126 (2010) 20–26.
- [22] F.A. Gondim, E. Gomes-Filho, C.F. Lacerda, J.T. Prisco, A.D. Azevedo Neto, E.C. Marques, Pretreatment with H_2O_2 in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress, *Braz. J. Plant Physiol.* 22 (2010) 103-112.
- [23] A. Wahid, M. Perveen, S. Gelani, S.M.A Basra, Pretreatment of seed with H_2O_2 improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins, *J. Plant. Physiol.* 164 (2007) 283-294.
- [24] F.J. Xu, C.H. Jin, W.J. Liu, Y.S. Zhang, X.Y. Lin, Pretreatment with H_2O_2 Alleviates Aluminum-induced Oxidative Stress in Wheat Seedlings, *J. Integr. Plant Biol.* 53 (2011) 44–53.
- [25] A. Mhamdi, G. Queval, S. Chaouch, S. Vanderauwera, F. V. Breusegem, G. Noctor. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models, *Journ. Exp. Bot.* 61 (2010) 4197-4220.

- [26] J. Feierabend, S. Dehne, Fate of the porphyrin cofactors during the light-dependent turnover of catalase and of the photosystem II reaction-center protein D1 in mature rye leaves, *Planta* 198 (1996) 413-422.
- [27] X. Ye, S.Q. Pan, J. Kuc, 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, *Phytopathology* 80 (1990) 1295-1299.
- [28] N. Sreenivasulu, S. Ramanjulu, K. Ramachandra-Kini, H.S. Prakash, H. Shekar-Shetty, H.S. Savitri, C. Sudhakar, Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with different salt tolerance, *Plant Sci.* 141(1999) 1-9.
- [29] A.K. Parida, A.B. Das, P. Mohanty, Defense potentials to NaCl in mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes, *J. Plant Physiol.* 161 (2004) 531-542.
- [30] B.D Mckersie, Y.Y. Leshem, Stress and stress coping and cultivated plants, Kluwer Dordrecht: Academic Publishes, 1994.
- [31] S. Agarwal, R.K. Sairam, G.C. Srivastava, A. Tyagi, R.C. Meena, Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings, *Plant Sci.* 169 (2005) 559-570.
- [32] J.V. Bannister, W.H. Bannister, G. Rotilis, Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase, *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 22 (1997) 110-180.
- [33] J.G. Scandalios, The rise of ROS, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 483-486.
- [34] E. Yıldıztugay, A.H. Sekmen, I. Turkan, M. Kucukoduk, Elucidation of physiological and biochemical mechanisms of an endemic halophyte *Centaurea tuzgoluensis* under salt stress, *Plant Physiol. Biochem.* 49 (2011) 816-824.
- [35] D.R. Hoagland, D.I. Arnon, The water-cultured method for growing plants without soil, California Agricultural Experiment Station, California, 1950.
- [36] C.N. Giannopolitis, S.K. Ries, Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants *Plant Physiol.* 59 (1977) 309–14.
- [37] R.F. Beers Jr., I.W. Sizer, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. Biol. Chem.* 195 (1952) 133–140.
- [38] Y. Nakano, K. Asada, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinash chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 22 (1981) 867-880.

- [39] H. Urbanek, E. Kuzniak-Gebarowska, K. Herka, Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase, *Acta Phys. Plant.* 13 (1991) 43–50.
- [40] B.J. Davis, Disk eletrophoresis-II: Method and applications to human serum proteins, *Ann NY Acad Sci.* 121(1964) 404-427.
- [41] W. Woodbury, A.K. Spencer, M.A. Stahmann, An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes, *Anal Biochem.* 44 (1971) 301-305.
- [42] R. Mittler, B.A. Zilinskas, Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium, *Anal. Biochem.* 212 (1993) 540-546.
- [43] J.L. Fielding, J.L. Hall, A biochemical and cytological study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*, *J. Exp. Bot.* 29 (1978) 969–981.
- [44] C. Beauchamp, I. Fridovich, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Bioch.* 44 (1971) 276-287.
- [45] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods in enzymol.* 52 (1978) 302-310.
- [46] J.H. Costa, E.F. Mota, M.V. Cambursano, M.A. Lauxmann, L.M.N. de Oliveira, M.D.G. Silva Lima, E.G. Orellano, D. Fernandes de Melo, Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata*, *J Plant Physiol.* 167 (2010) 561-570.

Capítulo III

(Artigo formatado conforme as normas da ABNT)

Efeitos da pulverização foliar com H₂O₂ na área foliar, nas trocas gasosas e nos teores de H₂O₂, ascorbato e glutationa em plantas de milho sob estresse salino

Effects of H₂O₂ leaf spray in the leaf area, gas exchange and in the concentrations of H₂O₂, ascorbate and glutathione in maize plants under salt stress

Franklin Aragão Gondim; Enéas Gomes-Filho; José Tarquinio Prisco

Resumo - O presente trabalho objetivou estudar os efeitos da aplicação foliar de H₂O₂ na área foliar, nos teores relativos de clorofila, nos teores relativos de água, nas trocas gasosas e nos teores de H₂O₂, ascorbato e glutationa de plantas de milho crescendo sob condições salinas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob condições hidropônicas. Oito dias após a semeadura, as plântulas foram pulverizadas com água destilada (controle) ou solução aquosa de H₂O₂ na concentração de 10 mM e, 48 h após o início da pulverização, foram submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM. Foram realizadas duas coletas: aos 7 e 14 dias da última adição de sal (DAS). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 (NaCl a 0 e 80 mM) × 2 (H₂O₂ a 0 e 10 mM), com cinco repetições. Os dados de cada tempo de coleta (7 e 14 DAS) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). O pré-tratamento das plantas de milho por meio da pulverização foliar com peróxido de hidrogênio induziu aclimatação das plantas ao estresse salino, revertendo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade. Sob condições salinas, o pré-tratamento com H₂O₂ ocasionou incrementos na área foliar, nos teores relativos de água, nos teores relativos de clorofila e nas trocas gasosas, bem como levou a diminuição nos teores de H₂O₂. O pré-tratamento por meio de pulverização foliar com H₂O₂ não alterou o estado redox dos antioxidantes analisados (ascorbato e glutationa).

Palavras-chave: Aclimatação. Ascorbato. Estresse salino. Fotossíntese. Glutationa. Peróxido de hidrogênio. Pré-tratamento. *Zea mays*

Abstract - The aim of this study was to evaluate the effects of H₂O₂ foliar application on leaf area, relative chlorophyll content, relative water content, gas exchange and contents of the H₂O₂, ascorbate and glutathione in maize plants under salt stress. The experiments were conducted in hydroponic conditions and maintained in greenhouse. Eight days after sowing (DAS), the seedlings were sprayed with 10 mM H₂O₂ solution or distilled water (as a control). Forty-eight hours after the spraying beginning, the seedlings were subjected to treatment with NaCl at 80 mM. After NaCl treatments, two harvests were carried out: at 7 and 14 days after the salt addition. The experimental design was completely randomized following a factorial arrangement 2 (NaCl at 0 or 80 mM) x 2 (H₂O₂ at 0 or 10 mM), with five replicates. The data for each harvest time were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared through Tukey's test ($P \leq 0.05$). The results showed that H₂O₂ foliar application promoted plant acclimation to salt stress, decreasing the salinity deleterious effects. The H₂O₂ foliar application increased the leaf area, relative chlorophyll content, relative water content, gas exchange and decreased the H₂O₂ content. The H₂O₂ foliar application did not change the redox state of the evaluated antioxidants (ascorbate and glutathione).

Keywords: Acclimation. Ascorbate. Glutathione. Hydrogen peroxide. Pretreatment. Photosynthesis. Salt stress. *Zea mays*.

Introdução

A salinidade afeta negativamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas, ocupando aproximadamente 20% da área cultivada no mundo. Dentre as terras irrigadas, acredita-se que cerca da metade encontra-se afetada pela salinidade (SAIRAM; TYAGI, 2004). Um dos eventos que ocorre sob condições de salinidade é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS mais comumente encontradas são o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e os radicais superóxido (•O₂⁻) e hidroxil (•OH) (AZEVEDO NETO *et al.*, 2008). As ROS são produzidas normalmente pelo metabolismo, contudo sua produção pode ser aumentada em plantas sob condições de estresse biótico ou abiótico (MØLLER *et. al.*, 2010). O equilíbrio entre a produção e a eliminação das ROS pode ser modificado sob condições de estresse salino (GILL *et al.*, 2010).

Os efeitos nocivos das ROS em plantas podem ser reduzidos ou eliminados por sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos (AZEVEDO NETO *et al.*, 2008). O sistema

enzimático é constituído pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do guaiacol (GPX) e peroxidase do ascorbato (APX) (AZEVEDO NETO *et al.*, 2008; MUNNS; TESTER, 2008). O não-enzimático inclui compostos lipofílicos (tais como tocoferóis e carotenóides) e hidrofílicos (tais como ascorbato e glutationa reduzida) que são capazes de eliminar as ROS (AZEVEDO NETO *et al.*, 2008).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos destaca-se o ascorbato, visto que nas plantas ele se encontra em concentrações tão elevadas quanto as de clorofila (MCKERSIE; LESHEN, 1994). O ascorbato atua como um redutor contra muitos radicais livres, minimizando os danos ocasionados pelo estresse oxidativo. Além disso, encontra-se relacionado a outras funções fisiológicas como o crescimento e a diferenciação das plantas (FOYER, 1993). Em *Arabidopsis*, o ascorbato parece exercer uma função importante na proteção das plantas contra o estresse salino. Um mutante deficiente na produção de ascorbato mostrou concentrações elevadas de H_2O_2 , sendo o acréscimo diretamente relacionado a uma diminuição na razão ascorbato reduzido/ascorbato total e a uma menor atividade das enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (HUANG *et al.*, 2005). O acúmulo de H_2O_2 ocasionou também redução nos teores de clorofila e assimilação de CO_2 . Já a aplicação exógena de ascorbato mostrou-se eficiente em reduzir os efeitos deletérios da salinidade sobre o crescimento e peroxidação de lipídios em plantas de trigo (ATHAR *et al.*, 2008), grão-de-bico (BELTAGI, 2008) e de tomate (SHALATA; NEUMANN, 2001).

A glutationa é um tripeptídeo (Glu-Cys-Gly) cuja função antioxidante pode ser atribuída à presença de grupos sulfidrila da cisteína (RENNEBERG, 1982). A glutationa pode reagir diretamente com o oxigênio singuleto e com os radicais $\cdot O_2^-$ e $\cdot OH$ e dessa forma atuar como uma substância eliminadora de ROS. Alguns autores observaram que os teores de glutationa aumentaram sob condições de estresse hídrico em plantas de girassol (SGHERRI; NAVARI-IZZO, 1995) e de estresse salino, em linhagens de células de amendoim (JAIN *et al.*, 2002).

A fotossíntese, juntamente com o crescimento celular, está entre os processos primários afetados pela salinidade (MUNNS *et al.*, 2006). Em muitas espécies de plantas, o declínio de produtividade pode estar associado à redução na taxa fotossintética (MELONI *et al.*, 2003). A redução da taxa fotossintética pela salinidade pode ocorrer direta ou indiretamente. Diretamente ocorre pela diminuição na disponibilidade de CO_2 causada pela limitação da difusão através dos estômatos e das células mesofílicas (FLEXAS *et al.*, 2007) ou por alterações no metabolismo da fotossíntese (LAWLOR; CORNIC, 2002). Indiretamente, a fotossíntese pode ser reduzida pelos efeitos nocivos gerados pelas ROS

produzidas sob condições de estresse (CHAVES; OLIVEIRA, 2004) que podem afetar seriamente a maquinaria fotossintética das folhas (ORT, 2001).

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. Conforme Szechynska-Hebda *et al.* (2012), o H₂O₂ é uma das ROS mais estáveis e por isso uma candidata mais provável a funcionar como molécula sinalizadora. Para Neill *et al.* (2002), o acréscimo nos níveis de H₂O₂ em resposta a vários estresses, constitui-se num fator chave que medeia o fenômeno de aclimatação 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. Tem sido verificado na literatura que a aplicação exógena de H₂O₂ tem conferido tolerância à salinidade por meio da ativação do sistema de defesa antioxidativo (GONDIM *et al.*, 2012; GONDIM *et al.*, 2010; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005; UCHIDA *et al.*, 2002). Contudo, não há informações sobre o pré-tratamento por pulverização foliar com H₂O₂ em plantas de milho sob condições salinas e seus efeitos na área foliar, nos teores relativos de clorofila, nos teores relativos de água, nas trocas gasosas e nos teores de H₂O₂, ascorbato e glutationa.

Material e métodos

Material vegetal, condições experimentais e tratamentos

As sementes de milho (*Zea mays* L.) do híbrido triplo BRS 3003 foram provenientes do Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil. O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Após seleção e desinfestação com solução de hipoclorito de sódio a 0,7%, as sementes foram semeadas em copos plásticos (200 mL) contendo vermiculita e irrigadas diariamente com água destilada, sob condições de casa de vegetação. Decorridos cinco dias da semeadura, as plântulas foram transferidas para bandejas de plástico contendo 10 L de solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950), diluída 1:2, onde permaneceram por dois dias para aclimatação. 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.

Após o período de aclimatação (oito dias após a semeadura), as plântulas foram pulverizadas com água destilada (controle) ou solução de H₂O₂ na concentração de 10 mM,

contendo o detergente Tween 20 a 0,025% a fim de quebrar a tensão superficial e facilitar a penetração. As aplicações foram realizadas às 06:30 h e repetidas após 24 h. Foram realizados três experimentos preliminares com diferentes concentrações de H₂O₂ (1, 10, 50 e 100 mM) a fim de encontrar a concentração de H₂O₂ utilizada (10 mM), bem como para confirmar os resultados obtidos. Após as aplicações foliares de água destilada ou H₂O₂, as plântulas com 48 h após o início da pulverização foram submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM, sendo a adição de sal realizada de forma parcelada (40 mM por dia para evitar o choque osmótico). Portanto, as plantas foram submetidas a quatro tratamentos: **1.** pulverizadas com água destilada e crescendo em ausência de salinidade (controle/água); **2.** pulverizadas com solução de H₂O₂ e crescendo em ausência de salinidade (controle/H₂O₂); **3.** pulverizadas com água destilada e crescendo sob condições salinas (salino/água); **4.** pulverizadas com solução de H₂O₂ e crescendo sob condições salinas (salino/H₂O₂).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 (NaCl a 0 ou 80 mM) \times 2 (H₂O₂ a 0 ou 10 mM), com cinco repetições. Foram realizadas duas coletas: aos 7 e 14 dias da última adição de sal (DAS). Os dados de cada tempo de coleta (7 ou 14 dias) foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Coleta do material e determinação da área foliar

Durante as coletas, as plântulas foram separadas em dois grupos distintos. No primeiro grupo, utilizou-se a 1^a folha completamente expandida a contar do ápice, bem como o terço distal da extremidade das raízes. O material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para posterior utilização nas determinações dos teores de H₂O₂, ascorbato reduzido e total e glutationa reduzida e total. No segundo grupo, as plantas foram separadas em raízes, colmos e folhas, quando, então, foram determinados a área foliar (AF) (LI-3100 Area Meter, Li-Cor., Inc, Lincoln, Nebraska, USA) e, posteriormente, os teores relativos de água (TRA).

Determinação dos teores relativos de água

Os teores relativos de água (TRA) foram determinados em amostras de 10 discos foliares com 1 cm de diâmetro. Os discos foliares foram obtidos de cinco plantas de cada tratamento. Os discos foram inicialmente pesados para obtenção da matéria fresca (MF), seguidos de 7 h de incubação em placas de Pétri contendo água destilada para obtenção da

matéria turgescente (MT). Em seguida, os discos foliares foram colocados em estufa com circulação forçada de ar (60 °C) para obtenção da matéria seca (MS). Empregou-se a fórmula: $TRA = [(MF - MS)/(MT-MS)] \times 100$ e os resultados foram expressos em percentagens.

Trocas gasosas e teores relativos de clorofila

Nos dias em que foram realizadas as coletas, entre 8 e 10 h, foram medidas a taxa de fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s), a taxa de transpiração (E) e a concentração interna de 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.

Preparação dos extratos de folhas e raízes

O extrato base para as análises químicas foi obtido através da maceração, a 4 °C, de 0,5 g de folhas ou extremidades de raízes com 5 mL de TCA a 5%. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a $12\,000 \times g$ por 15 min. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C e posteriormente utilizado nas determinações dos teores de H_2O_2 , ascorbato (reduzido e total) e glutationa (reduzida e total).

Determinação dos teores de H_2O_2

Os teores de H_2O_2 foram determinados conforme Sergiev, Alexieva e Karanov (1997). O meio de reação foi constituído de 0,5 mL de extrato; 0,5 mL de tampão fosfato de potássio a 10 mM, pH 7; e 1 mL de KI a 1 M. A mistura foi agitada e mantida em repouso ao abrigo da luz, à temperatura ambiente por 60 min. Em seguida, procedeu-se a quantificação dos teores de H_2O_2 através das medidas de absorbância a 390 nm, utilizando-se uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de H_2O_2 . Os teores foram expressos $\mu\text{mol H}_2O_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

Determinação dos teores de ascorbato

Os teores de ascorbato reduzido (AsA) e total [AsA + ascorbato oxidado (DHA)] foram determinados conforme Kampfenkel *et al.* (1995). Para a determinação do AsA, o meio de reação foi constituído de 100 µL de extrato, 300 µL de tampão fosfato de potássio a 200 mM, pH 7,4, 100 µL de água destilada, 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, 400 µL de H₂PO₄ a 42%, 400 µL de bipiridil a 4%, em etanol a 70%, e 200 µL de FeCl₃ a 3%. A mistura foi agitada e mantida em banho-maria a 42 °C, por 40 min, seguida de banho de gelo para interromper a reação.

O ascorbato total foi determinado após a redução do DHA pelo ditiotreitol (DTT). Para a determinação do ascorbato total adicionaram-se 100 µL de extrato, 100 µL de DTT a 10 mM (em tampão fosfato de potássio a 200 mM, pH 7,4), 200 µL tampão fosfato de potássio a 200 mM, pH 7,4, sendo a mistura agitada e mantida em banho-maria a 42 °C por 15 min. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de N-etilmaleiamida a 0,5% e aguardou-se o tempo de 2 min para então acrescentar os demais reagentes: 500 µL de TCA a 10%, 400 µL de H₂PO₄ a 42%, 400 µL de bipiridil a 4%, em etanol a 70% e 200 µL de FeCl₃ a 3%. A mistura foi agitada e mantida em banho-maria a 42 °C, por 40 min, seguida de banho de gelo para interromper a reação.

Os conteúdos de AsA e AsA + DHA foram determinados através das medidas de absorbância a 525 nm, utilizando-se uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de L-ascorbato. Os teores foram expressos em µmol g⁻¹ MF. O estado redox do ascorbato foi calculado usando a seguinte equação: [(AsA)/(AsA + DHA) × 100] e expresso em percentagem.

Determinação dos teores de glutationa

Os teores de glutationa reduzida (GSH) e total [GSH + glutationa oxidada (GSSG)] foram determinados conforme Griffith *et al.* (1980). Para a determinação da GSH, o meio de reação foi constituído de 200 µL de extrato, 2600 µL de tampão fosfato de sódio a 150 mM, pH 7,4 e 200 µL de tampão fosfato de sódio a 100 mM pH 6,8 contendo 5,5 ditio-bis 2 ácido-nitrobenzóico (DTNB) a 6 mM. A mistura foi agitada e mantida em banho-maria a 30 °C por 10 min, seguida de banho de gelo para interromper a reação.

A glutationa total foi determinada após a redução da GSSG pela ação da enzima redutase da glutationa (GR). Para a determinação da glutationa total adicionaram-se 200 µL de extrato e 1600 µL de tampão fosfato de sódio a 150 mM, pH 7,4 contendo uma unidade da

enzima GR. A mistura foi agitada e mantida em banho-maria a 30 °C por 10 min. Em seguida, adicionaram-se 1000 µL de NADPH a 150 µM e manteve-se a mistura de reação em banho-maria a 30 °C por 10 min. Finalmente, acrescentaram-se 200 µL de tampão fosfato de sódio a 200 mM, pH 6,8 contendo DTNB a 6 mM, sendo os tubos de ensaio agitados e deixados em banho-maria a 30 °C por 10 min, seguido de banho de gelo para interromper a reação.

Os conteúdos de GSH e GSH + GSSG foram determinados através das medidas de absorbância a 412 nm, utilizando-se uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de glutationa reduzida. Os teores foram expressos em µmol g⁻¹ MF. O estado redox da glutationa foi calculado usando a seguinte equação: [(GSH)/(GSH + GSSG) × 100] e expresso como em percentagem.

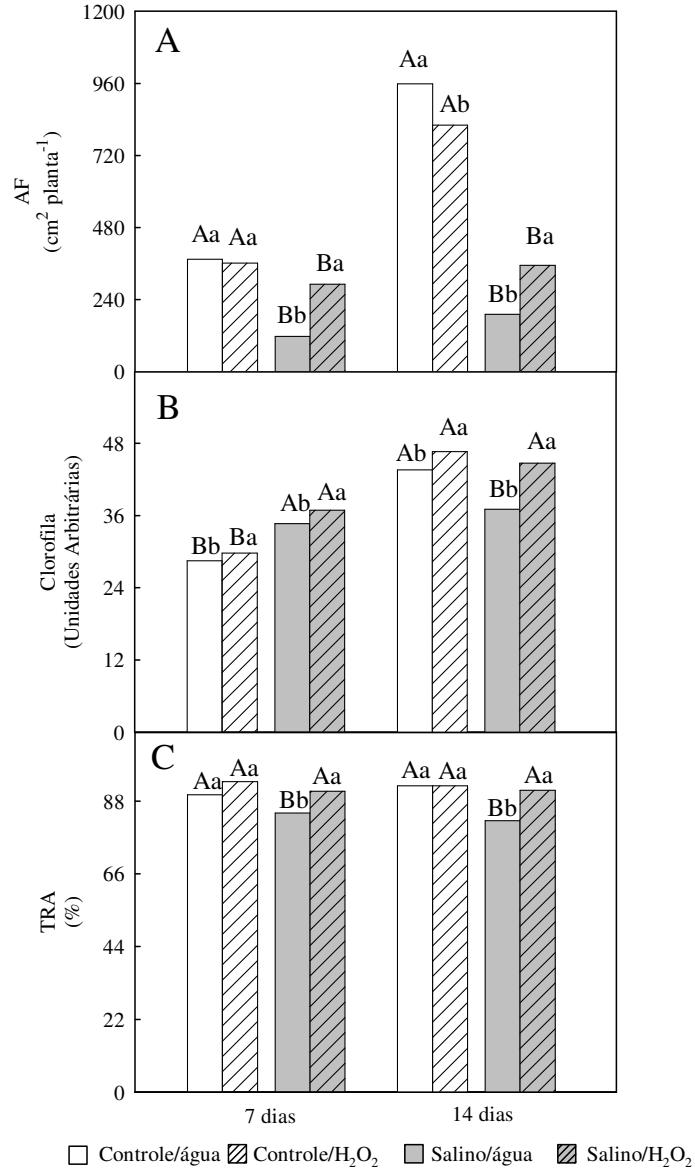
Resultados e discussão

Área foliar, teores de clorofila e teores relativos de água

A área foliar, os teores de clorofila e os teores relativos de água são mostrados na figura 1. A salinidade reduziu a área foliar (AF) das plantas de milho, em comparação àquelas desenvolvidas sob as condições controle e a pulverização foliar com H₂O₂ reduziu este efeito deletério (Figura 1A). Na coleta realizada aos 7 dias da última adição de sal (DAS), não houve diferença significativa entre os tratamentos controle/H₂O₂ e controle/água. Contudo, nos tratamentos salino/água e salino/H₂O₂ a AF mostrou-se 68% e 33% inferiores ao tratamento controle/água, respectivamente. Aos 14 DAS, o tratamento controle/H₂O₂ apresentou valores 15% inferiores aos do tratamento controle/água. A salinidade reduziu a AF nos tratamentos salino/água e salino/H₂O₂ em 80% e 63% respectivamente, em relação ao tratamento controle/água. Adicionalmente, aos 7 e 14 DAS, a AF no tratamento salino/H₂O₂ mostrou-se 146% e 85%, maiores do que no tratamento salino/água, respectivamente.

Reduções na AF em plantas submetidas à salinidade com NaCl têm sido observadas por vários autores (COSTA *et al.*, 2003 e FREITAS *et al.*, 2011, em feijão-de-corda; LACERDA *et al.*, 2003 e FREITAS *et al.*, 2011, em sorgo; AZEVEDO NETO *et al.*, 2005, em milho; FREITAS *et al.*, 2011, em algodão). Contudo, verificou-se que a pulverização foliar com H₂O₂ foi eficaz na reversão parcial dos efeitos deletérios da salinidade, fato já observado em monocotiledôneas crescendo sob condições salinas. Em milho, o H₂O₂ foi aplicado no sistema radicular (AZEVEDO NETO *et al.*, 2005) ou nas sementes

Figura 1. Área foliar (A), teores de clorofila (B) e teores relativos de água (C) de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM), aos 7 e 14 dias da última adição de sal. Em um mesmo tempo de coleta, valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H₂O₂, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



(GONDIM *et al.*, 2010); em plantas de trigo, nas sementes (WAHID *et al.*, 2007); e em plantas de arroz, no sistema radicular (UCHIDA *et al.*, 2002). Em todos os estudos supracitados, o H₂O₂ mostrou-se capaz em conferir às plantas maior tolerância à salinidade. Contudo, no presente trabalho, assim como observado por Gondim *et al.* (2012), o H₂O₂ foi aplicado por meio de pulverização foliar, mostrando-se uma nova alternativa para os agricultores, visto que poderia ser aplicado em diferentes estádios de desenvolvimento da planta.

Aos 7 DAS, observou-se um acréscimo nos teores de clorofila nas plantas submetidas à salinidade em comparação àquelas crescendo sob condições controle (Figura 1B). Verificou-se ainda que a pulverização foliar com H₂O₂ aumentou os teores de clorofila em relação às plantas que foram pulverizadas com água destilada. Além disso, neste mesmo tempo, o tratamento controle/H₂O₂ mostrou-se 5% superior ao tratamento controle/água. Nos tratamentos salino/água e salino/H₂O₂ os teores de clorofila mostraram-se 22% e 30% superiores aos tratamentos controle/água, respectivamente. Aos 14 DAS, os teores de clorofila no tratamento controle/H₂O₂ mostrou-se 7% superior ao tratamento controle/água. O tratamento salino/água foi 15% inferior ao tratamento controle/água. Contudo, no tratamento salino/H₂O₂, os teores de clorofila não diferiram significativamente do tratamento controle/água. Adicionalmente, aos 7 e 14 DAS, os teores de clorofila no tratamento salino/H₂O₂ mostraram-se 7% e 19%, maiores do que no tratamento salino/água, respectivamente.

Para Singh e Dubey (1995), a perda de clorofila é considerada um marcador celular de estresse salino. Outros autores trabalhando com plantas de milho expostas à salinidade encontraram diminuição nos teores de clorofila com o aumento da salinidade (TURAN *et al.* 2009; CHA-UM; KIRDMANEE, 2009). Meloni *et al.* (2003), trabalhando com plantas de algodão crescendo sob condições salinas, verificaram reduções nos teores de clorofila em cultivares sensíveis à salinidade. Já no cultivar considerado tolerante à salinidade, observou-se manutenção dos teores semelhantes aos das plantas que cresceram sob condições controle. Deste modo, o incremento nos teores de clorofila em consequência da salinidade (aos 7 DAS) e sua manutenção nas plantas do tratamento salino/H₂O₂ a valores semelhantes aos das plantas crescendo sob condições controle (14 DAS) parece estar relacionado com o aumento da tolerância ao estresse salino.

Aos 7 e 14 DAS, não foram encontradas diferenças significativas nos teores relativos de água (TRA) entre os tratamentos controle/água, controle/H₂O₂ e salino/H₂O₂ (Figura 1C). Contudo, os TRA sofreram decréscimos no tratamento salino/água de 6 e 11%, em relação ao

tratamento controle/água, aos 7 e 14 DAS, respectivamente. Adicionalmente, aos 7 e 14 DAS, os TRA no tratamento salino/ H_2O_2 mostraram-se 7% e 11%, maiores do que no tratamento salino/água, respectivamente.

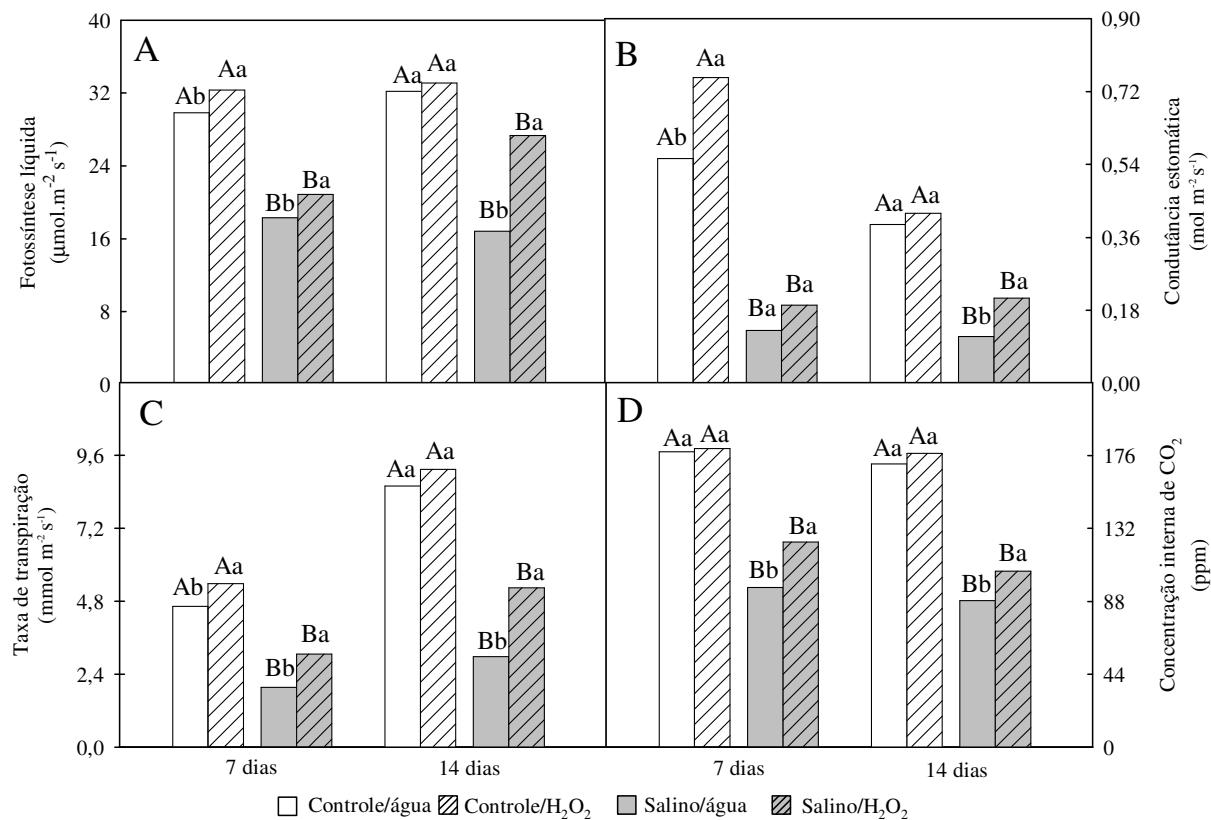
O decréscimo do vigor em plantas estressadas pode estar associado à reduções nos TRA, sendo essas reduções encontradas por outros autores (HALDER; BURRAGE, 2003, em plantas de arroz; FARKHONDEH, NABIZADEH e JALILNEZHAD *et al.*, 2012, em plantas de beterraba e KHOLOVA *et al.*, 2009, em planta de milho). Já Sairam, Rao e Srivastava (2002), e El-bassiouny e Bekheta (2005), trabalhando com genótipos de trigo com tolerância diferencial à salinidade, observaram reduções mais acentuadas nos TRA nas plantas do cultivar sensível. No presente trabalho, a aplicação foliar com H_2O_2 mostrou-se eficiente em diminuir os efeitos deletérios da salinidade sobre os TRA, visto que as reduções nesse parâmetro só foram detectadas no tratamento salino/água.

Taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática, taxa de transpiração e concentração interna de CO_2

Os resultados sobre a taxa de fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s), a taxa de transpiração (E) e a concentração interna de CO_2 (C_i) são mostrados na figura 2. Para A (Figura 2A), aos 7 DAS, o tratamento controle/ H_2O_2 mostrou-se 8% superior ao tratamento controle/água, contudo não houve diferença significativa entre esses dois tratamentos na coleta aos 14 DAS. Nesses dois tempos de coleta, a salinidade ocasionou redução em A . Aos 7 e 14 DAS, os valores de A no tratamento salino/água foram 39% e 48% inferiores aos dos respectivos tratamentos controle/água. Contudo, no tratamento salino/ H_2O_2 essas reduções foram menos acentuadas, sendo os valores 30% e 15% menores do que no tratamento controle/água, aos 7 e 14 DAS, respectivamente. Dessa forma, nesses dois tempos, os valores de A no tratamento salino/ H_2O_2 mostraram-se 15% e 62%, maiores do que no tratamento salino/água, respectivamente.

A condutância estomática (g_s) foi fortemente reduzida pela salinidade e a pulverização foliar com H_2O_2 mostrou-se eficaz na redução parcial deste efeito (Figura 2B). Aos 7 DAS, o tratamento controle/ H_2O_2 mostrou-se 36% superior ao tratamento controle/água. Contudo, não houve diferença significativa entre esses dois tratamentos aos 14 DAS. Aos 7 e 14 DAS, os valores de g_s no tratamento salino/água foram 77% e 70% inferiores aos do tratamento controle/água. Entretanto, no tratamento salino/ H_2O_2 estas reduções foram menos pronunciadas, 66% e 57% menores do que no tratamento controle/água, aos 7 e 14 DAS,

Figura 2. Taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C) e concentração interna de CO₂ (D) de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM), aos 7 e 14 dias da última adição de sal. Em um mesmo tempo de coleta, valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H₂O₂, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



respectivamente. Além disso, aos 7 e 14 DAS, os valores de g_s no tratamento salino/H₂O₂ mostraram-se 46% e 75%, maiores do que no tratamento salino/água, respectivamente.

A taxa de transpiração (E) (Figura 2C) apresentou comportamento semelhante à A e g_s . Este parâmetro foi fortemente reduzido pela salinidade e a pulverização foliar com H₂O₂ também se mostrou eficaz na redução parcial deste efeito. Aos 7 DAS, o tratamento controle/H₂O₂ apresentou valores *ca.* de 15% superiores aos tratamento controle/água. Contudo, não houve diferença significativa entre esses dois tratamentos aos 14 DAS. Aos 7 e 14 DAS, os valores de E no tratamento salino/água foram, respectivamente, 58% e 66% inferiores aos do tratamento controle/água. Todavia, no tratamento salino/H₂O₂ estas reduções foram menos acentuadas, sendo os valores 44% e 39% menores do que os dos tratamentos controle/água, aos 7 e 14 DAS, respectivamente. Adicionalmente, aos 7 e 14 DAS, os valores de E no tratamento salino/H₂O₂ mostraram-se 55% e 76%, maiores do que no tratamento salino/água, respectivamente.

Aos 7 e 14 DAS, a concentração interna de CO₂ (C_i) não diferiu significativamente entre os tratamentos controle/água e controle/H₂O₂ e foi reduzida em ambos os tratamentos salinos (Figura 2D). O tratamento salino/água mostrou-se 47% e 49% inferior ao tratamento controle/água, aos 7 e 14 DAS, respectivamente. Entretanto, no tratamento salino/H₂O₂, estas reduções foram menos pronunciadas e os valores foram 31% e 38% inferiores aos do tratamento controle/água. Além disso, aos 7 e 14 DAS, os valores de C_i no tratamento salino/H₂O₂ mostraram-se 28% e 20%, maiores do que no tratamento salino/água, respectivamente.

Em glicófitas, como as plantas de milho, acredita-se que a inibição da taxa fotossintética (A) pela salinidade possa ser atribuída, pelo menos em parte, ao fechamento estomático (STEDUTO *et al.*, 2000). Para Chatrath, Mandal e Anuradha (2000), durante o estresse salino, as plantas precisam fechar seus estômatos para evitar a perda excessiva de água e com isso restringem a entrada de CO₂. Silva *et al.* (2011), em plantas de pinhão manso, sugeriram que nos primeiros dias de exposição à salinidade, a taxa fotossintética teria sido reduzida simplesmente devido ao fechamento estomático ocasionado pela salinidade. Por outro lado, com a exposição mais prolongada à salinidade, os autores atribuíram a diminuição da fotossíntese aos efeitos estomáticos e bioquímicos. No presente trabalho, em ambos os tratamentos salinos (salino/água e salino/H₂O₂), a fotossíntese parece ter sido reduzida, pelo menos em parte, devido ao fechamento estomático. Corroborando com essa observação, os níveis de C_i foram baixos nos tratamentos salinos, mostrando haver limitação na entrada de

CO_2 e sua utilização pela maquinaria fotossintética. Contudo, de modo geral, para as trocas gasosas (A , g_s , E e C_i), verificou-se que os parâmetros foram reduzidos pela salinidade e que a pulverização foliar com H_2O_2 mostrou-se eficiente na reversão parcial destes efeitos deletérios. Semelhantemente, Wahid *et al.* (2007), trabalhando com plantas de trigo oriundas de sementes pré-tratadas com concentrações crescentes de H_2O_2 e submetidas à salinidade, observaram que o pré-tratamento de sementes de trigo com H_2O_2 , principalmente na concentração de 80 μM , foi capaz de 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.

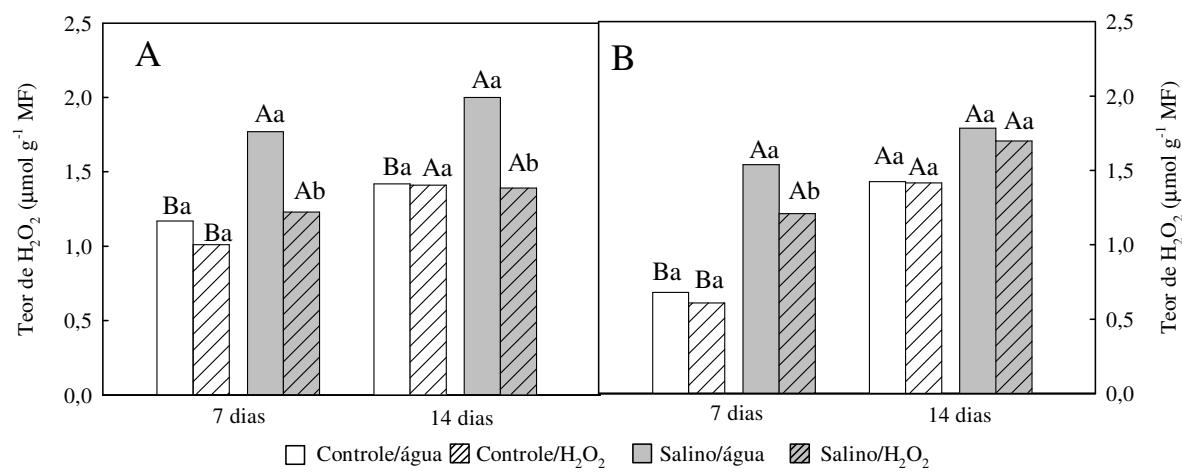
Teores de H_2O_2 nas folhas e raízes

Nas folhas (Figura 3A), de modo geral, o teores de H_2O_2 foram aumentados pela salinidade e a pulverização foliar com H_2O_2 mostrou-se eficiente em reduzir este efeito. O tratamento salino/água mostrou-se 51% e 44% superior ao tratamento controle/água, aos 7 e 14 DAS, respectivamente. Entretanto, no tratamento salino/ H_2O_2 , este acréscimo foi menos acentuado, sendo os valores 5% superiores aos do tratamento controle/água aos 7 DAS e não diferindo significativamente dos tratamentos controle aos 14 DAS. Adicionalmente, aos 7 e 14 DAS, os teores de H_2O_2 no tratamento salino/ H_2O_2 mostraram-se 31% e 30%, inferiores aos do tratamento salino/água, respectivamente.

Nas raízes (Figura 3B), aos 7 DAS, a salinidade também ocasionou incrementos nos teores de H_2O_2 sendo estes menos pronunciados nas plantas que receberam pulverização foliar com H_2O_2 . O tratamento salino/água mostrou-se 126% superior ao tratamento controle/água. No tratamento salino/ H_2O_2 , este acréscimo foi menos acentuado, sendo os valores 78% superiores aos do tratamento controle/água. Não houve diferenças significativas nos teores de H_2O_2 entre os tratamentos aos 14 DAS.

De acordo com Quan *et al.* (2008), o excesso de H_2O_2 pode conduzir ao estresse oxidativo em plantas, o qual pode ocasionar o processo de morte celular. Embora no presente trabalho tenha sido feita aplicação exógena de H_2O_2 , de modo geral, verificou-se que mesmo sob condições salinas, os teores de H_2O_2 foram mantidos próximos aos das plantas crescendo sob condições controle. Agarwal *et al.* (2005), trabalhando com plantas de trigo, sugeriram que o H_2O_2 produzido em resposta à aplicação exógena de Ca^{2+} ou moléculas sinalizadoras

Figura 3. Teores de H_2O_2 nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM) aos 7 e 14 dias da última adição de sal. Em um mesmo tempo de coleta, valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H_2O_2 , respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



(ABA e ácido salicílico) poderia induzir a síntese ou ativação de fatores de transcrição associados à indução de várias enzimas antioxidantes. Gondim *et al.* (2012), estudando o mesmo genótipo de milho aqui estudado, observaram que a pulverização foliar com H₂O₂ a 10 mM minorou o efeito do estresse salino na produção de matéria seca das plantas. Os autores atribuíram esse efeito ao observado estímulo do sistema enzimático antioxidativo, diminuindo os efeitos deletérios do estresse oxidativo gerado pela salinidade.

Teores de ascorbato reduzido e total e estado redox do ascorbato nas folhas e raízes

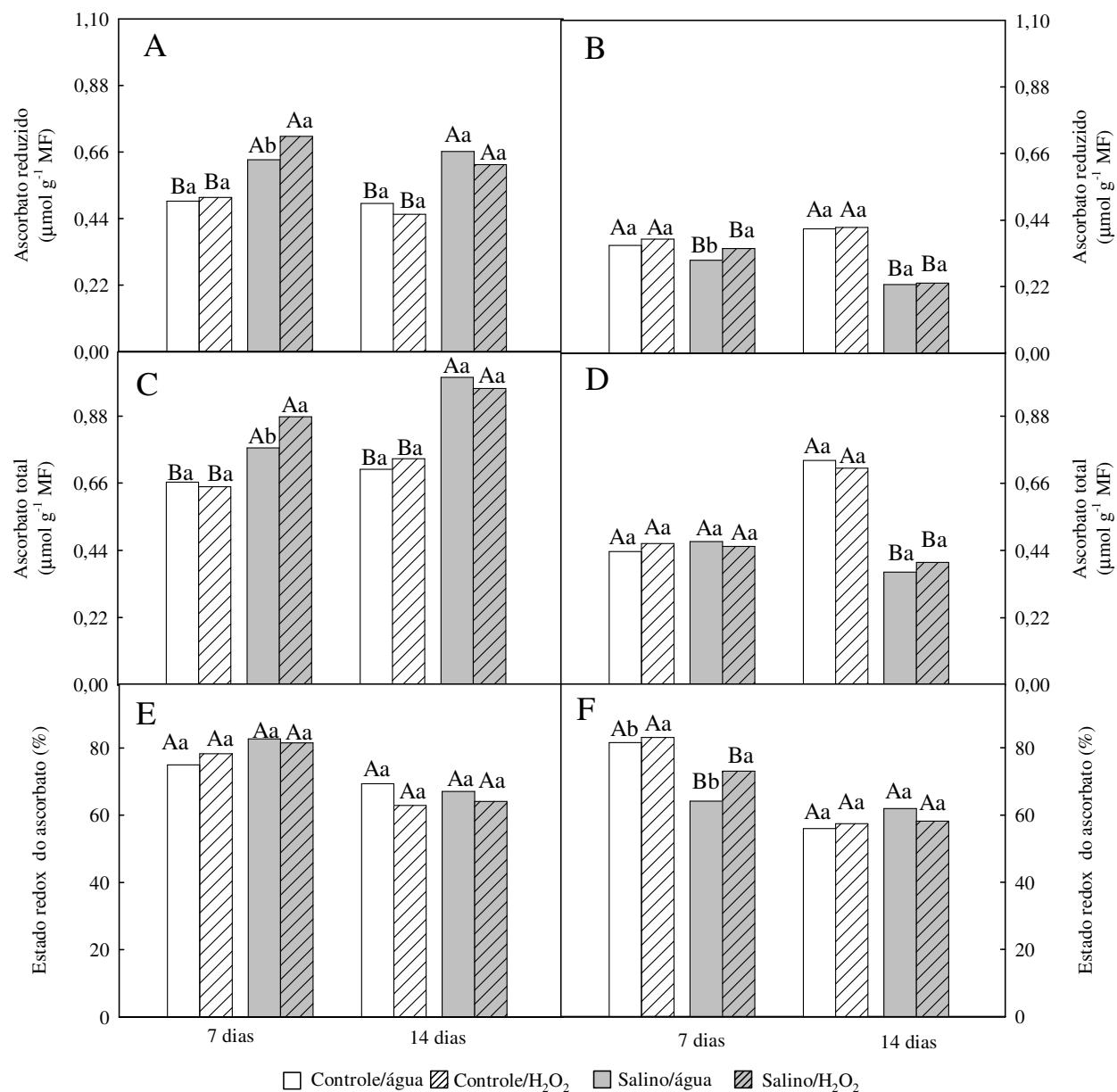
A salinidade aumentou os teores de ascorbato reduzido nas folhas das plantas de milho aos 7 e 14 DAS (Figura 4A), não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos controle/água e controle/H₂O₂. O tratamento salino/água mostrou-se 26% e 35% superior ao tratamento controle/água, aos 7 e 14 DAS, respectivamente. No tratamento salino/H₂O₂ das plantas coletadas aos 7 DAS, este acréscimo foi mais acentuado, sendo observado um valor 42% superior àquele do tratamento controle/água. Aos 14 DAS, não houve diferença significativa entre o tratamento salino/água e o tratamento salino/H₂O₂.

Os teores de ascorbato total nas folhas (Figura 4C) apresentaram comportamento semelhante ao do ascorbato reduzido nas folhas (Figura 4A), sendo aumentados pela salinidade e não havendo diferenças significativas entre os tratamentos controle/água e controle/H₂O₂, aos 7 e 14 DAS. O tratamento salino/água apresentou-se 18% e 40% superior ao tratamento controle/água, aos 7 e 14 DAS, respectivamente. Como verificado para os teores de ascorbato reduzido aos 7 DAS, no tratamento salino/H₂O₂ este acréscimo foi mais acentuado, sendo observado um valor 33% superior àquele do tratamento controle/água. Adicionalmente, aos 7 DAS, os teores de ascorbato total nas folhas do tratamento salino/H₂O₂ mostraram-se 12% maiores do que no tratamento salino/água.

Apesar de terem sido verificados incrementos nos teores de ascorbato reduzido nas folhas das plantas de milho (Figura 4A) em consequência da salinidade, este fato não se refletiu em um aumento do estado redox do ascorbato nas folhas (Figura 4E). Este fato pode ser explicado pelo incremento semelhante encontrado nos teores de ascorbato total nas folhas dos tratamentos salinos.

Diferentemente das folhas, nas raízes, os teores de ascorbato reduzido foram diminuídos em consequência da salinidade em ambas as coletas (Figura 4B). Aos 7 DAS, o tratamento salino/água apresentou valor 17% inferior àquele do tratamento controle/água, enquanto o tratamento salino/H₂O₂ sofreu redução de apenas 3% em comparação com o

Figura 4. Teores de ascorbato reduzido nas folhas (A) e nas raízes (B), teores de ascorbato total nas folhas (C) e nas raízes (D) e estado redox do ascorbato nas folhas (E) e nas raízes (F) de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM) aos 7 e 14 dias da última adição de sal. Em um mesmo tempo de coleta, valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H_2O_2 , respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



tratamento controle/água. Aos 14 DAS, não foram observados efeitos da pulverização foliar com H₂O₂ tanto em condições controle como em condições salinas. Contudo, constatou-se que ambos os tratamentos salinos sofreram redução de 45% em comparação com o tratamento controle/água. Porém, aos 7 DAS, os teores de ascorbato reduzido nas raízes do tratamento salino/H₂O₂ mostraram-se 17% maiores do que no tratamento salino/água.

Aos 7 DAS, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nos teores de ascorbato total das raízes (Figura 4D) das plantas de milho. Contudo, aos 14 DAS, os teores de ascorbato total nas raízes mostraram comportamento semelhante ao encontrado para os teores de ascorbato reduzido (Figura 4B), sendo reduzidos pela salinidade. Não foram observados efeitos da pulverização foliar com H₂O₂ tanto em condições controle como em condições salinas. Além disso, constatou-se que os tratamentos salinos sofreram redução média de 48% em comparação com o tratamento controle/água.

Aos 7 DAS, o estado redox do ascorbato nas raízes (Figura 4F) apresentou comportamento semelhante ao encontrado para os teores de ascorbato reduzido nas raízes (Figura 4B). Este fato pode ser justificado pela ausência de diferenças significativas nos teores de ascorbato total (Figura 4D) entre os tratamentos. Aos 14 DAS, apesar de terem sido encontradas reduções nos teores de ascorbato reduzido nas raízes em consequência da salinidade (Figura 4B), não foram detectadas diferenças significativas no estado redox do ascorbato entre os tratamentos. Este fenômeno pode ser explicado em consequência da semelhante diminuição nos teores de ascorbato total (Figura 4D) nos tratamentos salinos em comparação com os tratamentos controle.

O AsA é um composto solúvel presente de forma ubíqua nos organismos fotossintetizantes, agindo como um importante antioxidante nas células das plantas (NAKANO; ASADA, 1981). Tem sido verificado na literatura que os teores de AsA e as alterações no estado redox do ascorbato estão correlacionados diretamente com o aumento de tolerância a estresses em uma variedade de espécies de plantas (NOCTOR; FOYER, 1998; WANG *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2011). No entanto, no presente trabalho, o estado redox do ascorbato não foi alterado pela salinidade ou pela pulverização foliar com peróxido de hidrogênio, mas, mostrou-se elevado quando comparado com estudos realizados em plantas de trigo (XU *et al.*, 2011) e de arroz (BONIFÁCIO *et al.*, 2011) submetidas aos estresses por alumínio e NaCl, respectivamente. Além disso, os teores de ascorbato mostraram-se mais elevados nas folhas do que nas raízes. Sabe-se que as folhas são os locais onde ocorrem os processos de fotorrespiração e fotossíntese, e que este último pode ser reduzido devido aos efeitos nocivos gerados pelas ROS produzidas sob condições de estresse salino (CHAVES;

OLIVEIRA, 2004), as quais podem afetar seriamente a maquinaria fotossintética (ORT, 2001). É possível que as plantas de milho tenham aumentado os teores de ascorbato reduzido e total nas suas folhas como estratégia para combater os efeitos nocivos gerados pelas ROS sob condições de estresse salino. Para Noctor e Foyer (1998), o ascorbato pode reagir diretamente com radicais hidroxil, superóxido e oxigênio singuleto, podendo conferir proteção oxidativa em plantas expostas a estresses.

Teores de glutationa reduzida, total e estado redox da glutationa nas folhas e raízes

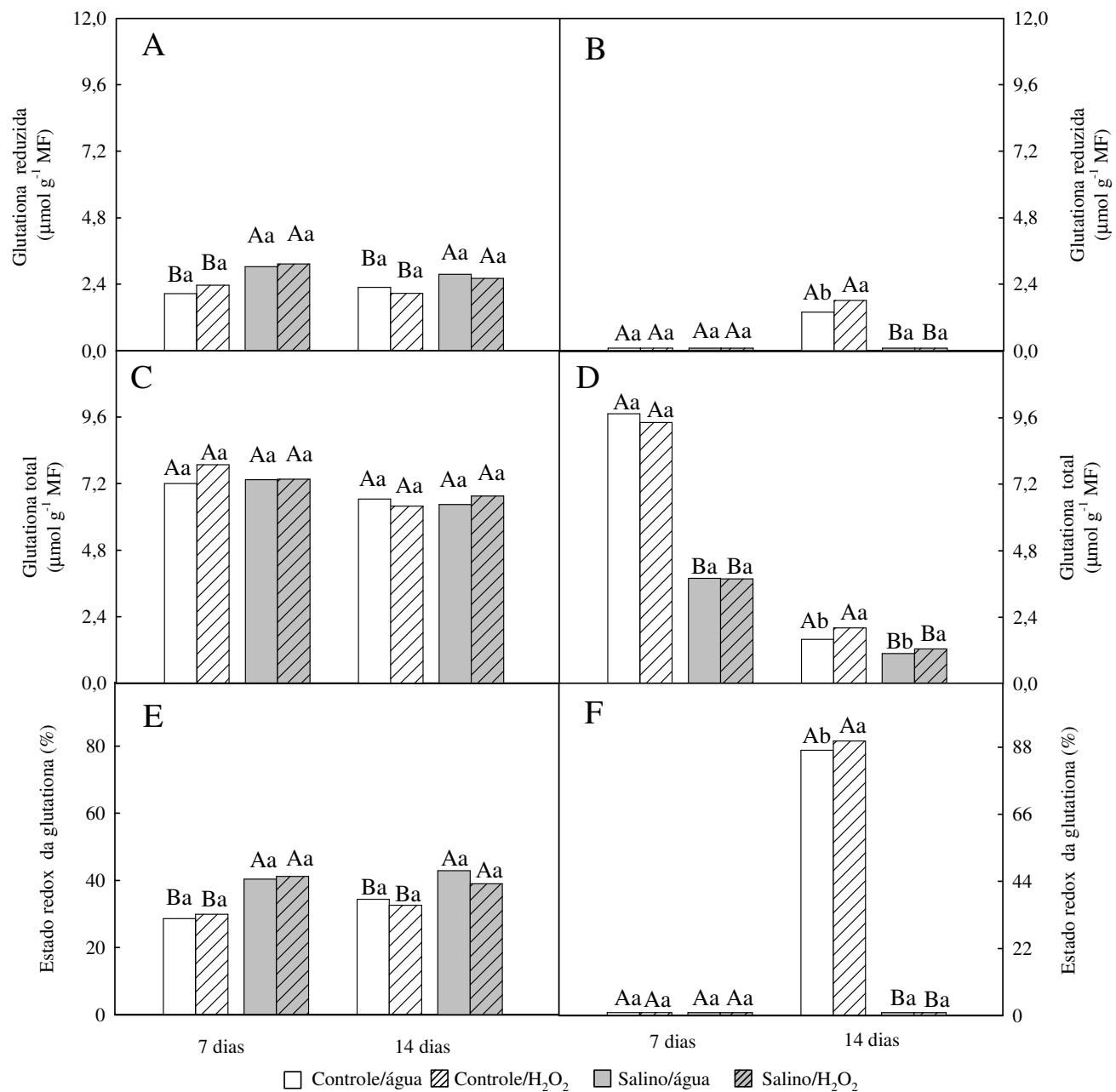
Nas folhas, os teores de glutationa reduzida (Figura 5A) foram aumentados pela salinidade em ambas as coletas. As médias dos tratamentos salinos apresentaram valores 49% e 18% superiores aos valores dos respectivos tratamentos controle/água, aos 7 e 14 DAS, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos salino/água e salino/ H_2O_2 . Já com relação os teores de glutationa total nas folhas, aos 7 e 14 DAS, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 5C). Por outro lado, o estado redox da glutationa nas folhas (Figura 5E) apresentou comportamento semelhante ao encontrado para os teores de glutationa reduzida nas folhas (Figura 5A). Este fato pode ser explicado em virtude da pequena variação encontrada nos teores de glutationa total (Figura 5C) entre os tratamentos. Adicionalmente, verificou-se que, em média, os teores de glutationa total nas folhas (Figura 5C) mostraram-se, aproximadamente, 7,6 vezes maiores do que os teores de ascorbato total nas folhas (Figura 4C).

Com relação aos teores de glutationa reduzida nas raízes (Figura 5B), somente foram encontrados valores significativos nos tratamentos controle e somente aos 14 DAS, sendo o controle/ H_2O_2 30% superior ao controle/água.

Aos 7 DAS, não foram observados efeitos da pulverização foliar com H_2O_2 nos teores de glutationa total nas raízes (Figura 5D) tanto em condições controle como em condições salinas. Contudo, constatou-se que ambos os tratamentos salinos sofreram redução de 61% em comparação com o tratamento controle/água. Aos 14 DAS, os teores de glutationa total nas raízes do tratamento controle/ H_2O_2 mostraram-se 25% superiores aos do tratamento controle/água.

A salinidade ocasionou redução nesse parâmetro. Os valores no tratamento salino/água foram 33% inferiores aos do tratamento controle/água. Contudo, no tratamento salino/ H_2O_2 estas reduções foram menos acentuadas, os valores foram 22% menores do que no tratamento controle/água. Adicionalmente, aos 14 DAS, os valores no tratamento salino/ H_2O_2 mostraram-se 15% maiores do que no tratamento salino/água.

Figura 5. Teores de glutatona reduzida nas folhas (A) e nas raízes (B), teores de glutatona total nas folhas (C) e nas raízes (D) e estado redox da glutatona nas folhas (E) e nas raízes (F) de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM) aos 7 e 14 dias da última adição de sal. Em um mesmo tempo de coleta, valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H_2O_2 , respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



O estado redox da glutationa nas raízes (Figura 5F) apresentou comportamento semelhante ao encontrado para os teores de glutationa reduzida nas raízes (Figura 5C), sendo detectados valores apenas nos tratamentos controle, aos 14 DAS. Adicionalmente, verificou-se que, em média, os teores de glutationa total nas raízes (Figura 5D) mostraram-se, aproximadamente, 5,5 vezes maiores do que os teores de ascorbato total nas raízes (Figura 4D).

A glutationa reduzida exerce uma importante função no sistema de defesa antioxidativa em folhas, visto que ela não somente participa no processo de regeneração do AsA através da enzima redutase do DHA como também reage diretamente com as ROS como oxigênio singuleto e o radical 'OH protegendo os grupos tiol das proteínas (ASADA, 1994). No presente trabalho, verificou-se que a salinidade aumentou os teores de GSH e AsA nas folhas das plantas de milho bem como foram detectadas reduções nos valores de g_s e A. Essas reduções em g_s ocasionadas pela salinidade podem reduzir o funcionamento normal do ciclo de Calvin, visto que nessas condições ocorre um aumento na razão NADPH/NADP⁺, havendo, portanto uma carência de NADP⁺ para a fase fotoquímica da fotossíntese. É possível que o aumento na atividade das enzimas que levam à síntese de GSH e AsA (enzimas do ciclo do ascorbato-glutationa como a redutase do monodesidroascorbato e a GR) possam contribuir para aumentar a disponibilidade de NADP⁺, visto que a ação conjunta dessas enzimas consome NADPH convertendo-o em NADP⁺, tornando-o disponível para o processo fotossintético.

Gossett, Millhollon e Lucas (1994), trabalhando com cultivares de algodão tolerantes à salinidade sugeriram que os elevados teores de antioxidantes, AsA e GSH, aliados a um eficiente ciclo do ascorbato-glutationa estariam associados à tolerância à salinidade. No presente trabalho, os teores de GSH foram aumentados em consequência da salinidade somente nas folhas, independente da aplicação foliar de H₂O₂. Nas raízes, região da planta em contato direto com a exposição ao sal, não foram detectados níveis significativos de GSH nas plantas submetidas à salinidade. Conforme Parida *et al.* (2004), para remover o H₂O₂ gerado durante o estresse oxidativo, pela ação da enzima peroxidase do ascorbato, as plantas requerem AsA e GSH. Os teores de AsA e GSH exercem um papel importante na defesa das plantas contra o estresse oxidativo e o seu decréscimo pode ser relacionado ao aumento na atividade das enzimas APX e GR que atuam na desintoxicação das ROS através do ciclo do ascorbato-glutationa (PARIDA *et al.*, 2004).

Conclusão

O pré-tratamento das plantas de milho por meio de pulverização foliar com peróxido de hidrogênio induziu aclimatação das plantas ao estresse salino, revertendo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade. Sob condições salinas, o pré-tratamento com H₂O₂ ocasionou incrementos na área foliar, nos teores relativos de água, nos teores relativos de clorofila e nas trocas gasosas, bem como levou à diminuição nos teores de H₂O₂. O pré-tratamento por meio de pulverização foliar com H₂O₂ não alterou o estado redox dos antioxidantes analisados (ascorbato e glutationa).

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.

ASADA, K. Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: BAKER, N.R.; BOWER, J.R. (Eds.). **Photoinhibition of Photosynthesis**, Oxford: Bios Scientific Publishers, 1994. pp. 131–145.

ATHAR, H.R.; KHAN, A.; ASHRAF, M. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 224–231, 2008.

AZEVEDO NETO, A. D. ; GOMES FILHO, E; PRISCO, J.T. Salinity and oxidative Stress. In: NAFEES A. KHAN, SARVAJEET SINGH. (Eds.). **Abiotic Stress and Plant Responses**. 1 ed. New Delhi: IK International, p. 58-82, 2008.

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.

BELTAGI, M.S. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) induced anabolic changes for salt tolerance in chick peã (*Cicer arietinum* L.) plants. **African Journal of Plant Science**, v. 2, p. 118-123, 2008.

BONIFÁCIO, A.; MARTINS, M. O.; RIBEIRO, C. W.; FONTENELE, A. V.; CARVALHO, F. E. L.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J. A. G. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, 1705–1722, 2011.

CHATRATH, A.; MANDAL, P.K.; ANURADHA, M. Effect of secondary salinization on photosynthesis in fodder oat (*Avena sativa* L.) genotypes. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.184, p. 13-16, 2000.

CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 87-98, 2009.

CHAVES, M.M.; OLIVEIRA, M.M.;. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2365–2384, 2004.

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.

EL-BASSIOUNY, H. M. S.; BEKHETA, M. A. Effect of Salt Stress on Relative Water Content, Lipid Peroxidation, Polyamines, Amino Acids and Ethylene of Two Wheat Cultivars. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 7, p. 363-368, 2005.

FARKHONDEH, R.; NABIZADEH, E.; JALILNEZHAD, N. Effect of salinity stress on proline content, membrane stability and water relations in two sugar beet cultivars. **International Journal of AgriScience**, v. 2, p. 385-392, 2012.

FLEXAS J.; DIAZ-ESPEJO, A.; GALME'S, J.; KALDENHOFF, R.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, p.1284–1298, 2007.

FOYER C.H. Ascorbic acid. In: ALSCHER, R.G.; HESS, J.L. (Eds.). **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press 31-58, 1993.

FREITAS, V. S. ; ALENCAR, N.L.M. ; LACERDA, C. F. de ; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Changes in physiological and biochemical indicators associated with salt tolerance in cotton, sorghum and cowpea. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 5, p. 264-271, 2011.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GONDIM,F.A; GOMES-FILHO, E.; COSTA, J.H.; ALENCAR, N.L.M.; PRISCO, J.T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 62-71, 2012.

GONDIM, F. A.; GOMES-FILHO, E.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T.; AZEVEDO NETO,A.D.; MARQUES, E.C. Pretreatment with H₂O₂ in maize seeds:effects on germination and seedling acclimation to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 103-112, 2010.

GOSSETT, D.R.; MILLHOLLON, E.P.; LUCAS, M.C. Antioxidant response to NaCl stress in salt tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. **Crop Science**, v. 34, p. 706–714, 1994.

GRIFFTH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analalytical Biochemistry**, v. 106, p.207-211, 1980.

HALDER K.P.; BURRAGE, S.W. Drought stress effects on water relations of rice grown in nutrient film technique. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.6, p. 441–446, 2003.

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.

HUANG, C.; HE, W.; GUO J.; CHANG, X.; SU, P.; ZHANG, L. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 3041– 3049, 2005.

JAIN M.; CHOUDHARY, D.; KALE, R.K; BHALLA-SARIN, N. Salt and glyphosate-induced increase in glyoxalase I activity in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea*). **Physiologia Plantarum**, v. 114, p. 499–505, 2002.

KAMPFENKEL, K.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analalytical Biochemistry**, v. 225, p.165-167, 1995.

KHOLOVA, J.; SAIRAM, R.K.; MEENA, R.C.; SRIVASTAVA, G.C. Response of maize genotypes to salinity stress in relation to osmolytes and metal ions contents, oxidative stress and antioxidant enzymes activity. **Biologia Plantarum**, v. 53, p. 249- 256, 2009.

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 isosmóticas de sais (NaCl + KCl). **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, p. 1-6, 2003.

LAWLOR D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 275-294, 2002.

McKERSIE, B.D.; LESHEM, Y.Y. **Stress and stress coping and cultivated plants**. 1a 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.

MØLLER, M.I.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-81, 2007.

MUNNS, R. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and others cereals. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1025-1043, 2006.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinash 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.

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.

ORT, D.R. When there is too much light. **Plant Physiology**, v. 125, p. 29-32, 2001.

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

QUAN, L.; ZHANG, B.; SHI, W.; LI, H. Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 2–18, 2008.

RENNEBERG, H. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2771-2781, 1982.

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.

SAIRAM, R.K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v. 86, p.407-421, 2004.

SERGIEV, I.; ALEXIEVA,V.; KARANOV, E. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. **Comptes Rendus Academie Bulgare des Sciences**, v.51, p.121-124, 1997.

SGHERRI, C.; NAVARI-IZZO, F. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defense mechanisms. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 25–30, 1995.

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

SILVA, E.N.; RIBEIRO, R.V.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants, **Scientia Agricola**, v. 68, p.62-68, 2011.

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.

STEDUTO, P., ALBRIZIO, R., GIORIO, P., SORRENTINO, G. Gas exchange response and stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation of sunflower under salinity. **Environmental of Experimental Botany**, v. 44, p. 243-255, 2000.

SZECHYN'SKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E.; DA_BROWSKA, G.; WE_DZONY, M.; VAN LAMMEREN, A. The effect of endogenous hydrogen peroxide induced by cold treatment in the improvement of tissue regeneration efficiency. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 34, p.547–560, 2012.

TURAN, M.A.; ELKARIM, A.H.A.; TABAN, N.; TABAN, S. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 893-897, 2009.

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.

WAHID, A.; PERVEEN, M.; GELANI, S.; BASRA, S.M.A. Pretreatment of seed with H₂O₂ 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.; LI J.L.; WANG, J.Z.; LI, Z.K. Exogenous H₂O₂ improves the chilling tolerance of manilagrass and mascarene grass by activating the antioxidative system. **Plant Growth Regulation**, 61, 195–204, 2010.

XU, F.J.; JIN, C.H.; LIU, W.J.; ZHANG, Y.S.; LIN, X.Y. Pretreatment with H₂O₂ Alleviates Aluminum-induced Oxidative Stress in Wheat Seedlings. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, p. 44–53, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram que o pré-tratamento das plantas de milho por meio da pulverização foliar com peróxido de hidrogênio induziu aclimatação das plantas ao estresse salino, revertendo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade. A pulverização com H₂O₂ influenciou positivamente vários processos fisiológicos e bioquímicos.

No primeiro capítulo, analisaram-se os efeitos do H₂O₂ no crescimento e no acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos em plantas de milho sob estresse salino. Observou-se que a pulverização foliar com H₂O₂ ocasionou um maior acúmulo de proteínas solúveis, carboidratos solúveis e NO₃⁻ bem como menores acúmulos de Na⁺ e Cl⁻. Constatou-se que as plantas pulverizadas com H₂O₂ e submetidas à salinidade apresentaram os níveis mais elevados de carboidratos solúveis, e que, provavelmente isso possa ter contribuído para o ajustamento osmótico das plantas de milho sob condições salinas. Aliado a isso, destacam-se os menores acúmulos dos íons tóxicos, Na⁺ e Cl⁻, bem como o aumento nos teores de um íon benéfico, o NO₃⁻.

No segundo capítulo, estudaram-se os efeitos da pulverização com H₂O₂ sobre o sistema enzimático antioxidativo e na peroxidação dos lipídios em plantas de milho submetidas à salinidade. Semelhantemente ao primeiro capítulo, a pulverização com H₂O₂ também se mostrou benéfica quando esses parâmetros foram analisados. Sob condições salinas, o sistema enzimático antioxidativo foi induzido e a peroxidação dos lipídios mostrou-se menor nas plantas pulverizadas com H₂O₂ do que naquelas pulverizadas com água. Contudo, atribui-se a redução dos efeitos deletérios da salinidade no crescimento das plantas, principalmente, ao aumento na atividade e na expressão da CAT.

No terceiro capítulo, estudaram-se os efeitos da pulverização com H₂O₂ sobre os teores de clorofila, os teores relativos de água, as trocas gasosas, os teores de H₂O₂, ascorbato e glutationa em plantas de milho submetidas à salinidade. De modo geral, como observado no primeiro e no segundo capítulo, a pulverização com H₂O₂ mostrou-se benéfica nesses

parâmetros. Contudo, o pré-tratamento por meio de pulverização foliar com H₂O₂ não alterou o estado redox dos antioxidantes analisados (ascorbato e glutationa).

De modo geral, conclui-se que a pulverização foliar com H₂O₂ se apresenta como uma alternativa para minimizar os efeitos deletérios da salinidade sobre as plantas de milho.

ANEXOS

Efeitos do H₂O₂ no crescimento e acúmulo de solutos em plantas de milho sob estresse salino¹

Effects of H₂O₂ on the growth and solutes accumulation in maize plants under salt stress

Franklin Aragão Gondim², Enéas Gomes-Filho^{3*}, Elton Camelo Marques⁴ e José Tarquinio Prisco³

Resumo - Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da aplicação foliar de H₂O₂ no crescimento e nos teores de solutos orgânicos e inorgânicos de plantas de milho desenvolvidas sob condições salinas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob condições hidropônicas. Oito dias após a semeadura, as plântulas foram pulverizadas com água destilada (controle) ou solução aquosa de H₂O₂ na concentração de 10 mM e, 48 h após o inicio da pulverização, foram submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM. Foram realizadas duas coletas, com 96 e 240 h do inicio da pulverização. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 (NaCl a 0 ou 80 mM) x 2 (H₂O₂ a 0 ou 10 mM), com cinco repetições. Os dados de cada tempo de coleta (96 h ou 240 h) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$). O pré-tratamento de pulverização das plantas de milho com H₂O₂ induziu aclimatação das plantas de milho ao estresse salino, revertendo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade no crescimento. Este efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, a um maior acúmulo de proteínas solúveis, carboidratos solúveis e NO₃⁻, bem como a um menor acúmulo de íons tóxicos (Na⁺ e Cl⁻) nas folhas.

Palavras-chave - Aclimatação. Estresse salino. Peróxido de hidrogênio. Pré-tratamento. *Zea mays*.

Abstract - The aim of this study was to evaluate the effects of foliar application of H₂O₂ on plant growth and on the levels of organic and inorganic solutes in maize plants under salt stress. The experiments were conducted in a greenhouse under hydroponic conditions. Eight days after sowing, the seedlings were sprayed with a 10 mM H₂O₂ solution or with distilled water (as a control). Forty-eight hours after the beginning of spraying, they were subjected to treatment with NaCl at 80 mM. Two harvests were carried out: 96 and 240 hours after the start of spraying. The experimental design was completely randomized following a factorial arrangement 2 (NaCl at 0 or 80 mM) x 2 (H₂O₂ at 0 or 10 mM), with five replicates. The data for each harvest time (96 or 240 h) were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared through Tukey's test ($P \leq 0.05$). The results showed that foliar application of H₂O₂ produced acclimation of the plants to salt stress, decreasing the deleterious effects of salinity on the growth of the maize. This effect can be attributed, at least partially, to a larger build up of proteins, and soluble carbohydrates and NO₃⁻ as well as lower levels of Cl⁻ and Na⁺ in the foliage.

Key words - Acclimation. Salt stress. Hydrogen peroxide. Pre-treatment. *Zea mays*.

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 31/08/2010; aprovado em 31/01/2011

Trabalho submetido selecionado no primeiro Simpósio Brasileiro de Salinidade realizado de 12-15/10/2010 em Fortaleza, Ceará, Brasil; Parte da Tese do primeiro autor em desenvolvimento no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará

²Instituto Federal de Educação, Ciéncia e Tecnologia do Ceará, Quixadá-CE, Brasil e Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, CC/UFC, Fortaleza-CE, Brasil, aragaofg@ifce.edu.br

³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e Instituto Nacional de Ciéncia e Tecnologia em Salinidade, CC/UFC, Caixa Postal 6039, 60.455-970, Fortaleza-CE, Brasil, egomesf@ufc.br, jtprisco@uol.com.br

⁴Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, CC/UFC, Fortaleza-CE, Brasil, eltonmarques@gmail.com



Research article

Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize

Franklin Aragão Gondim¹, Enéas Gomes-Filho*, José Hélio Costa, Nara Lídia Mendes Alencar, José Tarquínio Prisco

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal)/CNPq, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6039, 60440-970 Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2012

Accepted 19 April 2012

Available online 25 April 2012

Keywords:

Acclimation
Antioxidative enzymes
Catalase
Hydrogen peroxide
Malondialdehyde
Oxidative stress
Salt stress
Zea mays

ABSTRACT

Pretreatment in plants is recognized as a valuable strategy to stimulate plant defenses, leading to better plant development. This study evaluated the effects of H_2O_2 leaf spraying pretreatment on plant growth and investigated the antioxidative mechanisms involved in the response of maize plants to salt stress. It was found that salinity reduced maize seedling growth when compared to control conditions, and H_2O_2 foliar spraying was effective in minimizing this effect. Analysis of the antioxidative enzymes catalase (EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7), ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.1) and superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) revealed that H_2O_2 spraying increased antioxidant enzyme activities. Catalase (CAT) was the most responsive of these enzymes to H_2O_2 , with higher activity early (48 h) in the treatment, while guaiacol peroxidase (GPX) and ascorbate peroxidase (APX) were responsive only at later stages (240 h) of treatment. Increased CAT activity appears linked to gene expression regulation. Lower malondialdehyde levels were detected in plants with higher CAT activity, which may result from the protective function of this enzyme. Overall, we can conclude that pretreatment with H_2O_2 leaf spraying was able to reduce the deleterious effects of salinity on seedling growth and lipid peroxidation. These responses could be attributed to the ability of H_2O_2 to induce antioxidant defenses, especially CAT activity.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Salinity is a major abiotic stress that affects plant growth and limits crop productivity worldwide [1] and occurs on both irrigated and non-irrigated lands. High salt concentrations cause ion imbalance and hyperosmotic stress in plants [2]. The problem has been aggravated by agricultural practices such as irrigation that can cause water tables to rise and concentrate salts in the root zone [3]. Poor quality water for irrigation and poor drainage are the main reasons for increases in soil salinity in irrigated areas [4].

Reactive oxygen species (ROS) production is a normal biochemical event that occurs in plants. The ROS are generated

during normal cellular metabolism, but there is evidence that ROS production is increased when plants are subjected to biotic or abiotic stresses [5]. The main ROS production sites are the chloroplasts, mitochondria and peroxisomes [6]. The most commonly produced ROS are singlet oxygen (1O_2), hydrogen peroxide (H_2O_2), and superoxide ($^{\bullet}O_2$) and hydroxyl ($^{\bullet}OH$) radicals [7,8]. H_2O_2 can also be produced in the cytosol, plasma membrane and extracellular matrix by various oxidases and cell wall peroxidases [9]. ROS, when in excess, can have detrimental effects on plant metabolism, causing oxidative damage to proteins, nucleic acids and lipids essential to membrane structure [5,10].

The harmful effects of ROS in plants can be reduced or eliminated by non-enzymatic and enzymatic defense systems [8]. The non-enzymatic system includes hydrophilic compounds (such as ascorbate and reduced glutathione) and lipophilic compounds (such as tocopherols and carotenoids) capable of quenching ROS [8]. The enzymatic defense system consists of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX) and other enzymes of the ascorbate–glutathione cycle [3,8,11].

The antioxidant enzyme system is recognized as the main mechanism of plant tolerance to environmental stress [12]. Many

Abbreviations: APX, ascorbate peroxidase; CAT, catalase; DM, dry mass; FM, fresh mass; GPX, guaiacol peroxidase; HAS, hours after spraying; H_2O_2 , hydrogen peroxide; MDA, malondialdehyde; RDM, root dry mass; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription and polymerase chain reaction; SDM, shoot dry mass; SOD, superoxide dismutase.

* Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 9405; fax: +55 85 3366 9829.

E-mail address: egomesf@ufc.br (E. Gomes-Filho).

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Av. Contorno Norte, 10 Parque Industrial, CEP: 61925-315, Maracanaú, Ceará, Brazil.