



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

CIBELLE GOMES GADELHA

ACLIMATAÇÃO À SALINIDADE INDUZIDA POR NITROPRUSSIATO DE SÓDIO NA
GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE PINHÃO-
MANSO.

FORTALEZA

2015

CIBELLE GOMES GADELHA

ACLIMATAÇÃO À SALINIDADE INDUZIDA POR NITROPRUSSIATO DE SÓDIO NA
GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE PINHÃO-
MANSO.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.

FORTALEZA

2015

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

-
- G12a Gadelha, Cibelle Gomes.
Aclimação à salinidade induzida por nitroprussiato de sódio na germinação e no desenvolvimento inicial de plântulas de pinhão-manso/ Cibelle Gomes Gadelha. – 2015.
124 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação(mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
1. *Jatropha curcas*. 2. Expressão gênica. 3. Estresse salino. I. Título.

CDD 574.192

CIBELLE GOMES GADELHA

ACLIMATAÇÃO À SALINIDADE INDUZIDA POR NITROPRUSSIATO DE SÓDIO NA
GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE PINHÃO-
MANSO.

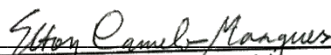
Dissertação submetida à
coordenação do programa de pós-
graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Aprovada em: 05/02/2015

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Enéas Gomes Filho (orientador)
Universidade Federal do Ceará- UFC



Dr. Elton Camelo Marques



Dr. Pedro Dantas Fernandes
Universidade Federal de Campina Grande- UFCG

FORTALEZA

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido o dom da vida e ter me protegido e abençoado.

À Nossa Senhora pelas graças concedidas e pelo exemplo de mulher que foi.

Aos meus familiares, Maria de Lourdes Gomes, Edilberto Braga Gadelha, José Guedes Gadelha Neto, Marlene Gomes de Moura e Isabella Gadelha, que foram meus alicerces em todos os momentos de vitórias e derrotas.

A Itallo Leandro Bezerra, pelo amor, carinho e paciência.

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

Ao professor Pedro Dantas Fernandes e ao Dr Elton Camelo Marques, por aceitarem participar de minha banca examinadora, pela compreensão e pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Ao amigo Rafael de Souza Miranda, pelo companheirismo e pela ajuda em todas as etapas deste experimento.

Aos demais amigos e colegas que compõem ou compuseram o Laboratório de Fisiologia Vegetal, Daniel Farias de Oliveira, Gyedre dos Santos Araújo, Ian Nunes Valença, Prof. Joaquim Enéas Filho, Lineker de Sousa Lopes, Luckas Huriel Duarte de Menezes, Maria Lílian dos Santos Silva, Maria Liliane dos Santos Silva, Nara Lídia Mendes Alencar, Nathália Dias de Oliveira Amaral, Paulo André Ferreira de Freitas, Stelamaris de Oliveira Paula, Valdinéia Soares Freitas e Viviane Ruppenthal, pela convivência e por me ajudaram direta ou indiretamente no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. José Hélio Costa, por disponibilizar o espaço e os recursos de seu laboratório, bem como por me auxiliar e orientar durante a execução das análises de expressão gênica.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado durante os anos de 2013 a 2015.

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

RESUMO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie oleaginosa, pertencente à família Euphorbiaceae, considerada uma boa alternativa agrícola para regiões áridas e semiáridas, como o Nordeste brasileiro. A salinização dos solos é um problema bastante comum nessas regiões, diminuindo a produtividade de diversas culturas agrícolas, por afetar negativamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Portanto, torna-se relevante a realização de estudos acerca do desenvolvimento dessa espécie em condições de estresse salino, bem como a avaliação dos efeitos do óxido nítrico (NO) na indução da aclimatação à salinidade. Objetivou-se com esse trabalho avaliar os efeitos do pré-tratamento de sementes com nitroprussiato de sódio (NPS), um composto que libera espontaneamente NO em solução, sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de pinhão-manso em condições de estresse salino. A concentração de NPS foi definida em um primeiro experimento, no qual sementes de pinhão-manso foram germinadas em folhas de papel germitest umedecidas com água destilada (pré-tratamento com água) ou com soluções de NPS a 50, 75, 100 e 200 μM , por um período de 24 h (pré-tratamento com NPS). Posteriormente, as sementes foram transferidas para folhas de papel germitest umedecidas com água destilada (condição controle) ou com NaCl a 100 mM (tratamento salino). Decorridos oito dias após o pré-tratamento (DAPT), as plântulas pré-tratadas com NPS a 75 μM foram as que apresentaram melhor desempenho em condições salinas, principalmente devido às reduções significativas nos teores de Na^+ e na peroxidação lipídica, e pelas melhoras na mobilização de reservas e do crescimento. Com base nisso, foi realizado um segundo experimento, visando-se ampliar os estudos desse pré-tratamento na fisiologia e na bioquímica das plântulas de pinhão-manso sob condições de estresse salino. O pré-tratamento das sementes com NPS a 75 μM resultou em uma melhor germinação e mobilização de reservas, bem como em um maior crescimento das plântulas em condições salinas, em comparação às não pré-tratadas. Além disso, o pré-tratamento promoveu uma redução no acúmulo dos íons Na^+ e Cl^- , em condições de estresse salino. Os danos oxidativos no endosperma e no eixo embrionário das plântulas de pinhão-manso foram atenuados pelo pré-tratamento com NPS. Isso se deveu, pelo menos em parte, à indução do sistema antioxidativo, enzimático ou não enzimático, sob condições de estresse salino, bem como pela redução dos teores de H_2O_2 , sob tais condições. A análise da expressão gênica da catalase e da redutase da glutathiona foi concordante com o aumento em atividade dessas enzimas, promovido pelo pré-tratamento com NPS sob condições de salinidade. Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que o pré-tratamento com NPS foi eficiente na indução da aclimatação das plântulas de pinhão-manso ao estresse salino, principalmente por propiciar uma melhor homeostase iônica e redox.

Palavras-chave: Estresse salino, expressão gênica, *Jatropha curcas*, metabolismo oxidativo, óxido nítrico

ABSTRACT

The jatropha (*Jatropha curcas* L.) is an oilseed species, belonging to the family Euphorbiaceae, considered a good alternative to agricultural arid and semi-arid regions, such as the Brazilian Northeast. The soil salinization is a common problem in these regions, reducing the productivity of several crops, by negatively affect the growth and plant development. Therefore, it becomes important to carry out studies on the development of this species in salt stress conditions, as well as the assessment of the effects of nitric oxide (NO) in the induction of acclimation to salinity. This study evaluated the effects of pre-treatment of seeds with sodium nitroprusside (SNP), a compound that spontaneously releases NO in solution on germination and early development of jatropha seedlings in salt stress conditions. The concentration of NPS was set in a first experiment, in which jatropha seeds were germinated in germitest moistened sheets of paper with distilled water (pretreatment with water) or with NPS solutions of 50, 75, 100 and 200 M for a period of 24 hours (pre-treatment with SNP). Subsequently, the seeds were transferred to moistened sheets germitest with distilled water (control conditions) or 100 mM NaCl (saline treatment). After eight days after the pre-treatment (DAPT), the pretreated seedlings with NPS to 75 uM showed the best performance in saline conditions, mainly due to significant reductions in levels of Na⁺ and lipid peroxidation, and the improvements in mobilization of reserves and growth. Based on this, we performed a second experiment, which aimed to confirm the observed results and expand the studies of pretreatment on physiology, biochemistry and molecular biology of jatropha plants under salt stress. Pretreatment of seeds with NPS to 75 uM resulted in better germination and mobilization of reserves, as well as further growth of seedlings in saline conditions, compared to non-pretreated. Furthermore, the pretreatment was a decrease in the accumulation of Na⁺ and Cl⁻ ions in saline stress conditions. Oxidative damage in the endosperm and embryo axis of jatropha seedlings were attenuated by pretreatment with NPS. This was due, at least in part, to induction of antioxidant system, both enzymatic, nonenzymatic as under conditions of salt stress, as well as the reduction in H₂O₂ concentration under these conditions. The analysis of gene expression of CAT and GR was consistent with the increase in activity of these enzymes, promoted by pretreatment with NPS under saline conditions. Based on these results, it is concluded that pretreatment with NPS was efficient in inducing acclimatization of jatropha seedlings to salt stress, mainly for allowing a better ionic and redox homeostasis.

Keywords: gene expression, *Jatropha curcas*, nitric oxide, oxidative metabolism, salt stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias enzimáticas de eliminação de espécies reativas de oxigênio, enfatizando o ciclo do ascorbato-glutationa.....	28
Figura 2	Matéria seca do endosperma e do eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	51
Figura 3	Comprimento da parte aérea e da radícula de plântulas de pinhão-mansoso aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	53
Figura 4	Teor de potássio no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	54
Figura 5	Teor de sódio no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	55
Figura 6	Teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	57
Figura 7	Matéria seca do endosperma e do eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	60
Figura 8	Comprimento da parte aérea e da radícula de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	62
Figura 9	Foto das plântulas de pinhão-mansoso com 40 horas após o pré-tratamento e aos 2 e 3 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	63
Figura 10	Teor de potássio no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	64
Figura 11	Teor de sódio no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	66

Figura 12	Teor de cloreto no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	67
Figura 13	Teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	68
Figura 14	Teor de peróxido de hidrogênio no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	70
Figura 15	Atividade da dismutase do superóxido no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	72
Figura 16	Atividade da catalase no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	73
Figura 17	Atividade da peroxidase do ascorbato no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	74
Figura 18	Atividade da peroxidase do guaiacol no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	76
Figura 19	Atividade da redutase da glutatona no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	77
Figura 20	Teor de glutatona reduzida no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	79
Figura 21	Teor de glutatona oxidada no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansoso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	80

Figura 22	Estado redox da glutaciona no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansinho aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	82
Figura 23	Teor de ascorbato reduzido no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansinho aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	83
Figura 24	Teor de ascorbato oxidado no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansinho aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	85
Figura 25	Estado redox do ascorbato no endosperma e no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansinho aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	86
Figura 26	Eletroforese em gel de agarose evidenciando as bandas de RNA ribossomal e cloroplastidial e os produtos de amplificação por PCR semiquantitativa (cDNA).....	89
Figura 27	Expressão gênica relativa das isoformas 1, 2 e 3 da catalase no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansinho aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	91
Figura 28	Expressão gênica relativa das isoformas 1 e 2 da redutase da glutaciona no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansinho aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização das principais espécies reativas de oxigênio (ROS).....	25
Tabela 2	Lista dos genes utilizados nas análises de RT-qPCR, seus respectivos produtos gênicos e sequências de <i>primers</i>	44
Tabela 3	Componentes da reação de síntese do DNA complementar (cDNA) e seus respectivos volumes.....	45
Tabela 4.	Componentes da PCR semiquantitativa e seus respectivos volumes.....	46
Tabela 5	Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação de sementes de pinhão-manso aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	49
Tabela 6	Porcentagem de germinação de sementes de pinhão-manso aos 2, 3 e 4 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS, sob condições controle ou de estresse salino.....	50
Tabela 7	Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação de sementes de pinhão-manso aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com NPS a 75 μ M, sob condições controle ou de estresse salino.....	58
Tabela 8	Porcentagem de germinação de sementes de pinhão-manso aos 2, 3 e 4 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS a 75 μ M, sob condições controle ou de estresse salino.....	59
Tabela 9	Razões de leituras de absorvância entre 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e entre 260 nm e 230 nm (A_{260}/A_{280}) e concentrações de RNA total, em μ g/ μ L, extraídos de eixos embrionários de plântulas de pinhão-manso aos 1, 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento das sementes com NPS a 75 μ M, sob condições controle ou de estresse salino.....	88
Tabela 10	Temperaturas de anelamentos selecionadas para os genes testados como constitutivos e genes alvos por qPCR.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

- APX** – Peroxidase do ascorbato
- AsA** – Ascorbato (reduzido)
- AsA/(AsA + DHA)** – Estado redox do ascorbato
- CAT** – Catalase
- DHA** – Desidroascorbato
- DHAR** – Redutase do desidroascorbato
- GPX** – Peroxidase do guaiacol
- GR** – Redutase da glutatona
- GSH** – Glutatona (reduzida)
- GSSG** – Glutatona oxidada
- GSH/(GSH + GSSG)** – Estado redox da glutatona
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio
- IVG** – Índice de velocidade de germinação
- MDHA** – Monodesidroascorbato
- MDHAR** – Redutase do monodesidroascorbato
- NO** – Óxido nítrico
- NPS** – Nitroprussiato de sódio
- O₂** – Radical superóxido
- OH** – Radical hidroxil
- qPCR** – PCR quantitativa
- RT-qPCR** – PCR quantitativa em tempo real
- RT** – Reação da transcriptase reversa
- ROS** – Espécies reativas de oxigênio
- SOD** – Dismutase do superóxido
- TBARS** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TMG** – Tempo médio de germinação
- %G** – Percentagem de germinação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Justificativa	16
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
1.3 Revisão de literatura	19
1.3.1 O pinhão-manso	19
1.3.2 Estresse salino	21
1.3.2.1 Efeitos do estresse salino na germinação e no crescimento das plantas	21
1.3.2.2 Efeito iônico	22
1.3.3 Metabolismo oxidativo	23
1.3.3.1 Espécies reativas de oxigênio	23
1.3.3.2 Sistema antioxidativo enzimático	26
1.3.3.3 Sistema antioxidativo não enzimático	28
1.3.4 Óxido nítrico	30
1.3.4.1 Aspectos gerais	30
1.3.4.2 Aclimação a estresses mediada pelo óxido nítrico	31
2. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Material vegetal e condições de germinação	34
3.2 Testes de germinação	34
3.3 Medidas de comprimento e determinação da matéria seca	35
3.4 Teores de íons inorgânicos	36
3.5 Peroxidação lipídica	36
3.5.1 Preparação do extrato	36
3.5.2 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	37

3.6 Delineamento experimental e análise estatística do Experimento I	37
3.7 Determinação dos teores de peróxido de hidrogênio	37
3.8 Atividade das enzimas antioxidativas	38
3.8.1 Preparação do extrato enzimático	38
3.8.2 Dismutase do superóxido	38
3.8.3 Catalase	39
3.8.4 Peroxidase do ascorbato	39
3.8.5 Peroxidase do guaiacol	39
3.8.6 Redutase da glutathione	39
3.9 Concentração de proteína solúvel	40
3.10 Antioxidantes não enzimáticos: ascorbato e glutathione	40
3.10.1 Teores de ascorbato e estado redox	40
3.10.2 Teores de glutathione e seu estado redox	41
3.11 Análise da expressão dos genes da catalase e da redutase da glutathione	42
3.11.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	42
3.11.2 Extração do RNA total	42
3.11.3 Quantificação e análise da pureza do RNA total	43
3.11.4 Análise da integridade do RNA total	43
3.11.5 Síntese de DNA complementar (<i>cDNA</i>)	43
3.11.6 PCR semiquantitativa	45
3.11.7 <i>qPCR</i>	45
3.12 Delineamento experimental e análise estatística do Experimento II	47
4. RESULTADOS	48
4.1 Experimento I	48
4.1.1 Germinação	48
4.1.2 Crescimento	48
4.1.3 Íons	52

4.1.4. Peroxidação lípídica	56
4.2 Experimento II	56
4.2.1. Germinação das sementes	56
4.2.2. Matéria seca e crescimento das plântulas	59
4.2.3. Teores dos íons potássio, sódio e cloreto	61
4.2.4. Peroxidação de lipídios e conteúdo de H ₂ O ₂	65
4.2.5. Atividade das enzimas antioxidativas	71
4.2.6. Antioxidantes não enzimáticos: glutathiona e ascorbato	78
4.2.7. Expressão gênica das enzimas catalase e redutase da glutathiona	87
4.2.7.1. Qualidade do RNA extraído e do cDNA produzido.....	87
4.2.7.2 Temperatura de anelamento dos iniciadores por qPCR	87
4.2.7.3. Perfil de expressão gênica da CAT e GR por qPCR.....	87
5. DISCUSSÃO	94
5.1. Experimento I.....	94
5.2. Experimento II	96
6. CONCLUSÕES.....	106
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

O desenvolvimento humano no planeta tem acentuado as modificações ambientais, especialmente por contribuir para o aquecimento global e a destruição da camada de ozônio. Por serem sésseis, as plantas estão mais facilmente expostas a uma variedade de distúrbios ambientais. Quando essas condições desfavoráveis se prolongam ou se intensificam, pode haver grandes danos às culturas agrícolas (TAMAOKI *et al.*, 2004).

Aproximadamente 20% das terras cultivadas do mundo e em torno de metade das áreas irrigadas são afetadas pela salinidade (FAO, 2005; DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2012). Em áreas áridas e semiáridas, como o Nordeste brasileiro, esse problema é ainda mais grave, uma vez que essas regiões enfrentam a escassez de chuvas, bem como a elevada demanda evaporativa causada pelas altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar (DÍAZ-LOPES *et al.*, 2012). Além disso, a salinidade é um dos estresses ambientais mais importantes, tendo em vista que afeta negativamente vários processos fundamentais para o metabolismo vegetal, propiciando assim a diminuição da produtividade das culturas (LÄUCHLI; GRATTAN, 2007).

Os principais processos fisiológicos e bioquímicos afetados pelo estresse salino são a fotossíntese, a síntese proteica, o metabolismo dos lipídios e a expressão gênica (PARIDA; DAS, 2005). Em razão disso, a salinidade inibe a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas (SOLTANI; GHOLIPOR; ZEINALI, 2006).

O impacto da alta concentração salina no solo para as plantas é resultante, principalmente, dos efeitos primários dos sais, que podem ser de natureza osmótica, através da redução do potencial osmótico, de natureza iônica, através dos efeitos tóxicos dos próprios íons Na^+ e Cl^- , ou de ambas (ASHRAF, 2009). Secundariamente, a salinidade também pode induzir o estresse oxidativo, ao provocar a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS- do inglês, *reactive oxygen species*), tais como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\cdot), as quais são reativas e tóxicas para os vegetais e outros seres vivos, em geral (GILL *et al.*, 2013). Tais espécies, quando em altas concentrações, são prejudiciais à célula, podendo levar à peroxidação de lipídios e à inibição da síntese de proteínas, à inibição enzimática, dentre outros efeitos (MITTLER, 2002; AZEVEDO-NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008).

Contudo, a célula possui complexo sistema de defesa contra as ROS, que envolve mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (ASHRAF, 2009). Dentre o sistema enzimático, destaca-se uma grande variedade de enzimas, tais como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do guaiacol (GPX), a peroxidase do ascorbato (APX) e a redutase da glutathiona (GR). Por outro lado, o sistema não enzimático é formado por antioxidantes de baixo peso molecular, tais como ascorbato, tocoferol e glutathiona (AZEVEDO-NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008).

Muitos estudos têm evidenciado as modificações ocorridas nas plantas a fim de permitir sua sobrevivência sob estresse salino, que incluem principalmente a manutenção da homeostase iônica e redox (DEINLEIN *et al.*, 2014). Aclimatada ao estresse, a planta pode germinar, crescer e se desenvolver, garantindo a manutenção de sua produtividade, o que se torna importante para as culturas com relevância econômica e ecológica (LÄUCHLI; GRATTAN, 2007). Desse modo, é essencial compreender os mecanismos bioquímicos e fisiológicos utilizados pelas plantas para se adaptar ao estresse salino. Além disso, os estudos com compostos que facilitem a aclimação das espécies vegetais ao estresse salino podem constituir uma ferramenta útil no manejo sob tais condições.

O óxido nítrico (NO) é um composto gasoso e altamente reativo, envolvido em diversos processos fisiológicos e bioquímicos do metabolismo vegetal (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007). A aplicação exógena de NO ou de compostos que liberem NO pode promover a germinação, o crescimento, o desenvolvimento, bem como conferir às plantas tolerância a estresses bióticos e abióticos, principalmente devido à regulação da homeostase iônica e à preservação de um ambiente redox na célula, tendo em vista que esse composto contribui para a manutenção de baixos níveis de ROS, bem como aumenta a eficiência dos sistemas antioxidativos enzimáticos e não enzimáticos (SONG *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2009; ANJANEYULU *et al.*, 2014).

O pinhão-mansão é uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae, considerada uma boa alternativa agrícola para as regiões áridas e semiáridas, devido à sua rusticidade e à fácil aclimação a diferentes condições edafoclimáticas, características do Nordeste brasileiro, onde a salinização dos solos é bastante comum. Com relação às áreas agrícolas implantadas com a cultura, estima-se que existam mais de 30 mil hectares com potencial de produção superior a 90 mil toneladas de grãos/ano, capazes de gerar 58,5 mil toneladas/ano de torta, a qual pode ser utilizada como adubo orgânico, por ser rica em nitrogênio, fósforo e potássio (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).

O pinhão-manso é uma espécie de múltiplos atributos. Vale destacar que essa espécie é uma das oleaginosas potenciais para o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, devido ao alto conteúdo de óleo em suas sementes, bem como às características desse óleo (TAPANES *et al.*, 2008). Nos últimos anos, houve um aumento do cultivo dessa oleaginosa, impulsionado pelo programa citado, principalmente por ser uma espécie não alimentar e indicada para agricultura familiar (TEIXEIRA, 2005; LAVIOLA *et al.*, 2010).

Desde 2008, a EMBRAPA vem coordenando projetos de cunho nacional e internacional, a fim de prover conhecimento e domínio tecnológico do cultivo de pinhão-manso. Os projetos são executados por uma rede de pesquisa que inclui estudos nas áreas de prospecção da variabilidade genética, formação de bancos de germoplasma, melhoramento genético, manejo agrônômico, irrigação, fertilização, controle de plantas daninhas, controle de pragas e doenças, estudos econômicos e formas de propagação. Inclui também estudos específicos como biologia floral, fisiologia, resposta a estresses bióticos e abióticos e biotecnologia (marcadores moleculares). Apesar da demanda por informações sobre o pinhão-manso, essas pesquisas ainda estão em fase inicial (BHERING *et al.*, 2013; LAVIOLA *et al.*; 2013).

Tendo em vista isso, é necessário ampliar os conhecimentos acerca do desenvolvimento dessa espécie em condições de estresse salino. Além disso, os estudos com compostos capazes de induzir a aclimatação dessa espécie à salinidade, como o NO, são raros, tornando-se bastante relevante, podendo constituir uma alternativa viável para aumentar a produtividade dessas plantas sob condições salinas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do pré-tratamento de sementes com nitroprussiato de sódio (NPS), um composto que libera espontaneamente NO em solução, sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de pinhão-manso em condições de estresse salino, analisando os aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com NPS a 0, 50, 75, 100 e 200 μM na germinação de sementes de pinhão-manso sob condições controle ou de estresse salino;

- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com NPS a 0, 50, 75, 100 e 200 μM no crescimento, nos teores de K^+ , Na^+ e substâncias reativas ao ácido tiobitúrico (TBARS) após oito dias sob condições controle ou de estresse salino;
- Estabelecer a melhor concentração de NPS para o pré-tratamento das sementes de pinhão-manso;
- Avaliar os efeitos do pré-tratamento das sementes com NPS (em uma concentração previamente estabelecida), sob condições controle e de estresse salino:
 - na germinação e no estabelecimento de plântulas de pinhão-manso;
 - no crescimento e na mobilização de reservas de plântulas de pinhão-manso;
 - nos teores de peróxido de hidrogênio e na peroxidação de lipídios de endospermas e eixos embrionários de pinhão-manso;
 - nos teores de ascorbato e glutathiona em endospermas e em eixos embrionários de pinhão-manso, bem como nos seus respectivos estados redox;
 - na atividade das enzimas SOD, CAT, APX, GPX e GR em endospermas e em eixos embrionários de pinhão-manso;
 - na expressão gênica das isoformas da CAT e GR.

1.3 Revisão de literatura

1.3.1 O pinhão-manso

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie arbustiva, pertencente à tribo Joannesieae, da família Euphorbiaceae. O nome *Jatropha curcas* tem origem nas palavras gregas “jatos” (doutor) e “trophé” (alimento), em alusão a seu uso medicinal. Essa espécie parece ter sido oriunda da América Central (HELLER, 1996) e, atualmente, está distribuída pelas zonas tropicais e subtropicais do planeta, essencialmente na América Central e do Sul, África, Índia e Sudeste Asiático (KUMAR *et al.*, 2008). Sua distribuição abrangente se deve, pelo menos em parte, à sua resistência a condições edafoclimáticas desfavoráveis, tais como baixa pluviosidade e temperaturas elevadas (ACHTEN *et al.*, 2010; KATWAL; SONI, 2003). Sua distribuição geográfica se dá também devido a sua rusticidade, resistência a longas estiagens, bem como a pragas e doenças (EPAMIG, 2005). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que essa espécie é capaz de resistir a longos períodos de seca em diferentes fases do desenvolvimento (KHEIRA; ATTA, 2009; MAES *et al.*, 2009).

Jatropha curcas é uma espécie de crescimento rápido, alcançando normalmente dois a três metros de altura. Seu tronco possui, aproximadamente, 20 cm de diâmetro; possui raízes curtas e pouco ramificadas; seu caule é liso, de lenho mole e medula pouco desenvolvida; suas folhas são verdes, esparsas e brilhantes, largas e alternas, em forma de palma; apresentam floração monoica na mesma planta, mas com sexo separado; o fruto é uma cápsula ovóide, achatado nas extremidades, indeiscente, verde inicialmente, passa a amarelo, castanho e por fim preto, quando atinge o estado de maturação (ARRUDA *et al.*, 2004). Durante a estação seca, há perda das folhas, produzindo numerosas cicatrizes nos ramos. Essas folhas ressurgem após as primeiras chuvas, sendo considerada, assim, uma espécie decídua (KUMAR; SHARMA, 2008). As sementes são grandes e compostas por um tegumento, que compreende entre 30 e 40% da massa da semente, e um endosperma, tecido no qual há armazenamento de reservas (KUMAR; SHARMA, 2008). Segundo Souza *et al.* (2009), as sementes de pinhão-mansão são compostas por aproximadamente 40,33; 20,95 e 9,85% de lipídios, proteínas e amido, respectivamente. Além disso, essas sementes incluem ainda compostos tóxicos aos animais, destacando-se os ésteres de forbol e a curcina, uma proteína inativadora de ribossomos semelhante à ricina (LIN *et al.*, 2003).

O pinhão-mansão tem se destacado economicamente devido às suas importantes aplicações agrônômicas e industriais. Dentre essas, vale destacar seu uso na recuperação de solos contaminados ou sob processos de erosão, e sua utilização como cerca viva e adubo verde (JONGSCHAAP *et al.*, 2007). Além disso, essa espécie pode também ser utilizada para produzir sabão, cosméticos, pesticidas e medicamentos anticancerígenos (TONG *et al.*, 2006). Parece também ser adequado para fitorremediação (GARBUSU *et al.*, 2002; ALKORTA *et al.*, 2004). Na medicina doméstica, aplica-se o látex da planta como cicatrizante, hemostático e purgante. As raízes são consideradas diuréticas e antileucêmicas e as folhas são utilizadas para combater doenças cutâneas. Elas são eficazes também contra o reumatismo e possuem alto poder antissifilítico (ARRUDA *et al.*, 2004).

Dentre os múltiplos atributos de *Jatropha curcas*, a utilização de suas sementes para a produção de biodiesel tem recebido destaque nacional e internacional, principalmente por ser uma alternativa de combustível renovável, biodegradável e atóxico. Isso se deve, sobretudo, ao alto teor de óleo que as sementes de pinhão-mansão possuem, do qual 72% são ácidos graxos insaturados, com predomínio de ácido oleico, seguido de ácido linoleico (PARAWIRA, 2010). Além disso, o óleo das sementes de pinhão-mansão apresenta estabilidade para estocagem, baixa acidez, boa estabilidade de oxidação e baixa viscosidade (TAPANES *et al.*, 2008). Essas características são comparáveis com as do diesel de origem fóssil e estão de acordo com os

padrões americanos e europeus. (PARAWIRA, 2010). A não utilização desse óleo para fins nutricionais também é um atrativo importante para o uso dessa espécie como fonte de energia.

No Brasil, com o surgimento do Programa Brasileiro de Biodiesel e a grande demanda por óleos vegetais, o pinhão-manso tem sido uma alternativa promissora para o fornecimento de matéria-prima, principalmente nas regiões semiáridas do país. Esse fato não se deve somente às características do óleo mencionadas anteriormente, mas também ao seu baixo custo de produção e à sua adaptação a condições de solo e clima adversas, bem como à sua menor toxicidade em relação ao óleo extraído da mamona (MACIEL *et al.*, 2009).

1.3.2 Estresse salino

1.3.2.1 Efeitos do estresse salino na germinação e no crescimento das plantas

A germinação e o crescimento são as fases do desenvolvimento das plantas que apresentam maior vulnerabilidade a condições estressantes (RAJJOU *et al.*, 2012), entre os quais, o estresse salino, que inibe a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas. O sucesso da germinação e o crescimento são fatores determinantes para a produtividade das plantas, principalmente para aquelas que têm importância econômica e ecológica (LÄUCHLI; GRATTAN, 2007). Assim respostas positivas nesses fatores são importantes indicadores da tolerância das plantas a estresses (PARIDA; DAS, 2005).

O excesso de sais no meio reduz o potencial osmótico, acarretando a redução do potencial hídrico entre o substrato e a semente, o que irá inibir a embebição da semente e as etapas subsequentes da germinação. Além do efeito osmótico, os sais, principalmente os que contém Na^+ e o Cl^- , causam efeitos tóxicos a uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos (MUNNS; TESTER, 2008), desencadeando redução da germinação, da emergência e do crescimento da planta, podendo levá-la à morte (SOLTANI; GHOLIPOR; ZEINALI, 2006).

Em adição, a inibição da germinação propiciada pelo estresse salino coincide com o atraso na mobilização das reservas da semente (VOIGT *et al.*, 2009). Em sementes oleaginosas, os lipídios encontram-se na forma de misturas complexas de triacilgliceróis e são os estoques principais de carbono, que permitirão o crescimento das plântulas (ARAÚJO, 2013) Esses triacilgliceróis são armazenados em corpos lipídicos e seu catabolismo envolve a interação desses corpos lipídicos com os glioxissomos e as mitocôndrias. Esse processo é composto pelas fases de hidrólise (corpos lipídicos), β -oxidação (glioxissomos), ciclo do glioxilato (glioxissomos), ciclo do ácido cítrico (mitocôndrias) e por fim, síntese de sacarose (citosol). Diversos trabalhos têm evidenciado o retardo na mobilização de lipídios em virtude da

salinidade (BEN-MILED; ZARROUK; CHÉRIF, 2000; ASHRAF *et al.*, 2003; VOIGT *et al.*, 2009; ARAÚJO, 2013; LOPES, 2013; MARQUES *et al.*, 2013a; ALENCAR, 2014). Esses mesmos autores relacionam esse atraso com os danos causados pelos sais à germinação e ao crescimento das plantas. Segundo Eastmond *et al.* (2000), a eficiente mobilização de lipídios, em sementes oleaginosas, é essencial para o estabelecimento da plântula, bem como para seu vigor e bom desempenho em campo, propiciando tolerância aos efeitos nocivos dos estresses ambientais.

Com as alterações impostas pela salinidade em todos os processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, tais como a fotossíntese, a síntese proteica, o metabolismo dos lipídios, e a expressão gênica, uma das primeiras respostas das plantas envolve a redução do crescimento vegetativo, seguida de inibição/cessação da expansão celular (PARIDA; DAS, 2005). Esse fato parece estar relacionado com os efeitos do estresse salino sobre os processos de divisão e expansão celulares (MUNNS, 2002). Além disso, os efeitos negativos da salinidade no crescimento das plantas parecem estar associados com a redução do potencial osmótico da solução do substrato, com os distúrbios nutricionais, com os efeitos específicos de alguns íons ou com uma combinação desses fatores (ASHRAF; FOOLAD, 2006).

Vários estudos mostram os efeitos do estresse salino na germinação de sementes, mobilização de reservas e crescimento de plântulas de pinhão-mansão, havendo destaque para os realizados por Andréo-Souza *et al* (2010), Gao *et al* (2008), Cai *et al* (2011), Lopes, Gallão e Bertini (2013) e Alencar (2014). Todos esses autores mostraram que houve uma alteração significativa na germinação do pinhão-mansão em condições de salinidade, incluindo a porcentagem de germinação, a velocidade de germinação e a curva de embebição, além de alterações na mobilização de reservas, no crescimento e no estabelecimento das plântulas, bem como em outros processos fisiológicos e bioquímicos.

1.3.2.2 Efeito iônico

Como resultado do estresse salino, as plantas sofrem alteração no seu estado osmótico e no seu estado iônico. O efeito iônico ocorre em resposta ao excesso de sais no solo, que resulta da alteração na razão K^+/Na^+ e do acúmulo dos íons Na^+ e Cl^- nas células (MUNNS; TESTER, 2008). Além do aumento nos níveis de íons tóxicos às células, há também a diminuição dos íons Ca^+ , K^+ e Mg^{2+} , importantes para o metabolismo vegetal (ALEMAN *et al.*, 2011). Esses efeitos alteram a homeostase iônica da célula, afetando a atividade de muitas enzimas, a síntese proteica, a regulação da expressão gênica e outros processos celulares, como a fotossíntese, a transpiração e a divisão e expansão celulares (MUNNS; TESTER, 2008). Um dos processos

mais afetados pela alteração da homeostase iônica é o estado nutricional da planta, cujo desequilíbrio pode causar diminuição no crescimento e no desenvolvimento, podendo levar à morte celular (ZHANG *et al.*, 2006).

Silva *et al.* (2009), trabalhando com pinhão-mansão, observaram que, com o aumento da concentração de NaCl na solução nutritiva onde as plantas foram cultivadas, houve um aumento dos teores de Na⁺ e Cl⁻ e uma diminuição dos teores de K⁺ e NO₃⁻ nas folhas. A redução intensa dos conteúdos de K⁺, causada pela salinidade, teve sérias implicações no ajustamento osmótico do citosol e organelas de folhas de pinhão-mansão. Tal fato está relacionado com o prejuízo no crescimento foliar encontrado por esses autores. Eles observaram que houve um decréscimo da massa seca da planta com o aumento da salinidade, bem como intensos sintomas visuais de toxicidade causados pelo estresse salino, como clorose, seguida de necrose. Respostas semelhantes foram encontradas por Ashraf *et al.* (2003), Silva *et al.* (2009), Lopes (2013) e Marques *et al.* (2013), em seus estudos com girassol, pinhão-mansão, mamona e cajueiro anão-precoce, respectivamente.

Estudos recentes têm apontado a importância da regulação da homeostase iônica, através de um incremento na razão K⁺/Na⁺, como mecanismo importante para a tolerância de plantas à salinidade. A homeostase iônica deve envolver, principalmente, a exclusão de Na⁺ do citosol para o meio externo, ou sua compartimentação no vacúolo e a redistribuição de K⁺ (BLUMWALD, 2000; JAMES *et al.*, 2006; VOLKOV; AMTMANN, 2006; QUINTERO, FOURNIER; BENLLOCH, 2007; CHEN *et al.*, 2007; REJILI *et al.*, 2007; CHEN; POTTOSIN; CUIN, 2007; GHARS *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; ANJANEYULU *et al.*, 2014). No nível molecular, o controle pode ocorrer através dos canais transportadores de íons associados à membrana plasmática ou ao tonoplasto, que os carregam para fora da célula e até mesmo não permitem sua entrada no meio intracelular. Shi *et al.* (2003) já haviam demonstrado que a superexpressão de genes que codificam o antiporte Na⁺/K⁺ do vacúolo (NHX1) e da membrana plasmática (SOS1) promoveu a tolerância de plantas de *Arabidopsis thaliana* ao estresse salino.

1.3.3 Metabolismo oxidativo

1.3.3.1 Espécies reativas de oxigênio

As plantas são organismos aeróbicos, por isso necessitam do oxigênio como aceptor final de elétrons durante a respiração celular, para a produção eficiente de energia na cadeia mitocondrial, além de sua utilização nos processos fotooxidativos (VRANOVA, 2002; GARA *et al.*, 2010; MØLLER; SWEETLOVE, 2010; KRESLAVSKI *et al.*, 2012). Em seu estado fundamental, a molécula de oxigênio é estável e praticamente não reativa

(KARUPPANAPANDIAN *et al.*, 2011), no entanto a existência de dois elétrons desemparelhados na última camada de cada átomo de oxigênio constituinte torna essa molécula capaz de receber elétrons com alto grau de excitação (GILL; TUTEJA, 2010). Tal fato propicia a formação de intermediários que aparecem durante a redução do O₂ a H₂O, as ROS (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010). As principais formas de ROS são: o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxil (OH^{\cdot}).

Parte do O₂ consumido é reduzido a $\text{O}_2^{\cdot-}$, o qual então pode ser dismutado espontaneamente ou enzimaticamente (SOD), levando à produção de H₂O₂. Na presença de íons de metais de transição, o H₂O₂ pode sofrer quebra da ligação O-O, produzindo o radical OH^{\cdot} , numa reação denominada reação de Fenton. Quanto ao potencial de reatividade das ROS, o OH^{\cdot} é o mais reativo e em teoria, pode oxidar qualquer molécula biológica (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). As principais características dessas ROS são mostradas na Tabela 1.

Sob condições normais, níveis baixos de ROS são produzidos em balanço com as reações da respiração, fotossíntese, fotorrespiração, fosforilação oxidativa, β -oxidação de ácidos graxos e a atividade de vários tipos de oxidases. Essas reações ocorrem principalmente nos cloroplastos, nas mitocôndrias e nos peroxissomos (ARORA; SAIRAM, 2002; MØLLER *et al.*, 2007; CRUZ DE CARVALHO, 2008; DOWLING; SIMMONS, 2009; GILL; TUTEJA, 2010; MILLER *et al.*, 2010). Porém, sob condições adversas, a produção de ROS se eleva consideravelmente, como consequência do desequilíbrio entre a sua produção e os mecanismos de eliminação (MITTLER *et al.*, 2004; JALEEL *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 2010; KRESLAVSKI *et al.*, 2012). A falha no controle da homeostase redox leva ao fenômeno conhecido como estresse oxidativo. Uma vez que a salinidade e outros estresses bióticos ou abióticos são considerados agentes estressores primários, o estresse oxidativo é considerado um estresse secundário (GILL; TUTEJA, 2010).

As ROS podem causar danos às estruturas celulares, bem como a carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Dentre essas injúrias, pode-se destacar a desintegração da clorofila, a fragmentação do DNA, o extravasamento iônico, a peroxidação lipídica e, finalmente, a morte celular (MØLLER *et al.*, 2007). A peroxidação lipídica da membrana celular desencadeia alterações na fluidez da membrana, assim como a destruição de canais e receptores celulares importantes. Além disso, as modificações nas proteínas e no material genético podem implicar em mutações, ocasionando efeitos fisiológicos e bioquímicos prejudiciais (GILL; TUTEJA, 2010).

Tabela 1- Caracterização das principais espécies reativas de oxigênio (ROS)

ROS	Sítios de formação	Vias de formação	Reatividade
Radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$)	Cloroplastos, Mitocôndrias, Peroxisomos, Retículo endoplasmático e Membrana plasmática	Cadeia transportadora de elétrons e reação de oxidases	Moderada (alta para proteínas e baixa para carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos)
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Mesmos do $\cdot\text{O}_2^-$	Dismutação espontânea, via superóxido dismutase e reações da oxidase do glicolato e da oxidase dependente de flavina	Moderado (afinidade por grupos sulfidril de proteínas)
Radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$)	Locais adjacentes à formação do $\cdot\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ na presença de metais	Reação de Fenton: $\cdot\text{O}_2^- + \text{Fe}^{3+} \longrightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ Reação de Haber-Weis: $\text{H}_2\text{O}_2 + \cdot\text{O}_2^- \longrightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$	Alta

Fontes: Gill; Tuteja (2010); Moller; Jensen; Hansson (2007).

Nos últimos anos, muitos estudos têm demonstrado que, em baixas concentrações celulares, as ROS participam de processos de sinalização celular, mediando respostas a estresses, regulando o crescimento e o desenvolvimento e atuando no ciclo celular, na apoptose e na senescência (FORMAN *et al.*, 2010; GARA *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2010; POTTERS *et al.*, 2010). Logo, as plantas possuem mecanismos diferentes de regulação dessas ROS que irão depender do propósito, ou seja, quando em baixas concentrações, tem que haver uma modulação fina dessas ROS, para permitir a sinalização; porém, quando em altas concentrações, tem que haver desintoxicação celular (MITTLER, 2002). Esse papel duplo na célula vai depender do equilíbrio entre a produção e a remoção, assim como do tipo de ROS e do tempo de exposição (MØLLER *et al.*, 2007; GARA *et al.*, 2010). Para tal regulação, as plantas desenvolveram sistemas de defesa que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (APEL; HIRT, 2004), e a coordenação entre esses dois sistemas de eliminação de ROS relaciona-se com a tolerância das plantas ao estresse salino (APEL; HIRT, 2004; ASHRAF, 2009; BHUTTA, 2011; NABATI *et al.*, 2011; ANJANEYULU *et al.*, 2014).

1.3.3.2 Sistema antioxidativo enzimático

As enzimas do sistema antioxidativo exercem papéis fundamentais na proteção dos tecidos vegetais sob condições de estresse, incluindo a salinidade (APEL; HIRT, 2004; FOTOPOULOS *et al.*, 2008; JOSEPH; JINI, 2010). Muitos estudos têm demonstrado que, em algumas espécies, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes está diretamente relacionado com um eficiente sistema de limpeza de ROS e conseqüentemente, com o aumento da tolerância ao estresse salino (APEL; HIRT, 2004; ASHRAF, 2009; BHUTTA, 2011; NABATI *et al.*, 2011; ANJANEYULU *et al.*, 2014). Estão incluídas nesse sistema, a SOD, a CAT a GPX e a APX (SHALATA *et al.*, 2001).

A SOD constitui a primeira linha de defesa para a desintoxicação das plantas contra as ROS, pois ela catalisa a dismutação do $\cdot\text{O}_2^-$ em H_2O_2 e O_2 . A SOD é pertencente ao grupo das metaloenzimas e possui três isoformas, diferenciadas de acordo com o metal presente em seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), ferro (Fe-SOD) e manganês (Mn-SOD). As suas localizações celulares também são diferentes, as Cu/Zn-SOD são normalmente encontradas no citosol e nos cloroplastos, as Fe-SOD estão presentes nos cloroplastos, enquanto que as Mn-SOD situam-se nas mitocôndrias e peroxissomos (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; GILL; TUTEJA, 2010).

A CAT é uma enzima tetrâmera, contendo um grupo heme em cada subunidade e está localizada predominantemente nos peroxissomos e nos glioxissomos, onde ocorre formação de H_2O_2 em razão da β -oxidação de ácidos graxos, da fotorrespiração, do catabolismo de purinas e da superprodução induzida por condições de estresse (JALEEL *et al.*, 2009; GILL; TUTEJA, 2010; KARUPPANAPANDIAN *et al.*, 2011). A CAT e a SOD são consideradas como as mais eficientes enzimas antioxidantes. Essas enzimas atuam em conjunto, pois a CAT converte o H_2O_2 gerado pela SOD em água. Assim como a CAT, as peroxidases também utilizam o H_2O_2 em suas catálises, porém a processividade da CAT na eliminação dessa ROS é maior, sendo capaz de converter seis milhões de moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 por minuto (GILL; TUTEJA, 2010).

As peroxidases são enzimas capazes de oxidar vários substratos na presença de H_2O_2 ou de hidroxiperóxidos orgânicos. A GPX é uma peroxidase que decompõe o H_2O_2 pela oxidação do guaiacol, gerando o tetraguaiacol como produto final (KANG; SALTVEIT, 2001). Além do seu envolvimento nos mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos, a GPX também participa da biossíntese de lignina, através da decomposição do ácido-3-indol-acético (GILL *et al.*, 2010). Essa enzima é comumente encontrada no citoplasma e no apoplasto e está envolvida em processos de crescimento e desenvolvimento vegetal (NASRABADI *et al.*, 2011). Da mesma forma que a GPX, a APX também é uma peroxidase, entretanto essa enzima utiliza o ascorbato como doador de elétrons (JALEEL *et al.*, 2009). Ela se localiza principalmente nos cloroplastos e no citosol, podendo também estar associada às mitocôndrias, peroxissomos e ao apoplasto (MITTLER, 2002).

O ascorbato utilizado pela APX precisa ser regenerado, e isso se dá através do ciclo do ascorbato-glutationa (Figura 1). Nesse ciclo, o ATP e o NADPH são utilizados para a recuperação dos compostos oxidados, utilizando o ascorbato e a glutaciona como fontes redutoras. O ascorbato, nesse ciclo, pode ser regenerado por duas etapas enzimáticas. Na primeira, a enzima redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) converte o monodesidroascorbato (MDHA) em ascorbato, utilizando NADPH. Devido à instabilidade do MDHA, o desidroascorbato (DHA) pode ser gerado não enzimaticamente. Na segunda reação, o DHA é convertido a ascorbato pela redutase do desidroascorbato (DHAR), utilizando a glutaciona reduzida (GSH) como fonte redutora. Por fim, a glutaciona reduzida é recuperada pela ação da GR (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Para isso, a GR catalisa a redução da glutaciona oxidada (GSSG), formada durante a reação da DHAR, à custa de NADPH.

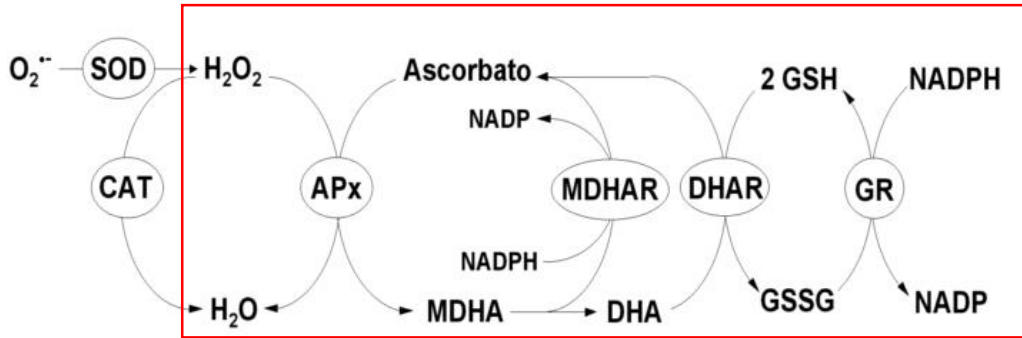


Figura 1- Vias enzimáticas de eliminação de espécies reativas de oxigênio, enfatizando o ciclo do ascorbato-glutationa (). **APX**– Peroxidase do ascorbato; **CAT**– Catalase; **DHA**– Desidroascorbato; **DHAR**– Redutase do desidroascorbato; **MDHA**– Monodesidroascorbato; **MDHAR**– Redutase do monodesidroascorbato; **GR**– Redutase da glutatona; **GSH**– Glutaciona reduzida; **GSSG**– Glutaciona oxidada; **SOD**– dismutase do superóxido (reproduzido de TEIXEIRA *et al.*, 2005).

A GR é uma enzima importante na desintoxicação de ROS, devido à sua capacidade de regeneração de GSH e à consequente manutenção de uma alta relação GSH/GSSG. Segundo Pang e Wang (2010), tais funções da GR estão relacionadas à tolerância de plantas à salinidade. Apesar do estresse, a manutenção de uma relação GSH/GSSG alta permite à célula um ambiente redutor, o qual é importante para impedir a agregação e a inativação enzimática (GILL *et al.* 2013). Outra função importante da GR é o aumento da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, garantindo maior disponibilidade de NADP^+ nos cloroplastos para aceitar elétrons oriundos da cadeia transportadora de elétrons (CTE), minimizando assim a formação de $\bullet\text{O}_2^-$ (AHMAD *et al.*, 2010).

1.3.3.3 Sistema antioxidativo não enzimático

Além dos mecanismos enzimáticos de eliminação de ROS, as plantas desenvolveram um sistema antioxidativo não enzimático o qual é formado por compostos de baixo peso molecular que podem ser de natureza lipofílica, como os tocoferóis e carotenoides ou hidrofílica, como o ascorbato e a glutaciona. Dentre os compostos não enzimáticos, a glutaciona e o ascorbato são considerados os mais importantes, pois além de sua ação direta sobre as ROS, também estão associados ao sistema enzimático, atuando como doadores de elétrons no ciclo do ascorbato-glutationa (NOCTOR; FOYER, 1998). Miller *et al.* (2010) afirmaram que tais compostos podem influenciar a expressão gênica, conferindo às plantas aclimatação à salinidade.

O ascorbato é o mais abundante antioxidante celular e tem função importante em diversos processos fisiológicos das plantas, como o crescimento, a diferenciação e o metabolismo (GILL; TUTEJA, 2010). Esse composto está presente principalmente no cloroplasto, mas pode ser encontrado também no citosol, no vacúolo, na mitocôndria e na matriz extracelular (POTTERS *et al.*, 2010). O ascorbato pode ser encontrado na forma reduzida (AsA), semi-oxidada (monodesidroascorbato - MDHA) e totalmente oxidada (desidroascorbato - DHA) e a formação/regulação dos níveis desses compostos é essencial para a manutenção de um ambiente redox adequado e para o funcionamento do ciclo do ascorbato-glutationa (POTTERS *et al.*, 2002). Além da função antioxidante, o ascorbato participa do ciclo das xantofilas e dos processos de divisão e expansão celulares (GALLIE, 2013).

O ascorbato é sintetizado principalmente pela via da D-manose/L-galactose. Essa via possui 6 etapas que ocorrem no citosol e na mitocôndria, as quais envolvem a oxidação da L-galactose a L-galactono-1,4-lactona (precursor imediato do ascorbato) e a oxidação da L-galactono-1,4-lactona a ascorbato (GALLIE, 2013).

A glutaciona é um tripeptídeo de baixa massa molecular, constituído por glutamato, cisteína e glicina (γ -Glu-Cys-Gly). Presente nos tecidos sob baixas concentrações, pode existir sob duas formas: a reduzida (GSH), que possui um grupo tiol livre; e a oxidada (GSSG), que possui uma ligação dissulfeto entre duas moléculas de GSH. A presença da Cys proporciona reatividade química e solubilidade em água ao grupo tiol da GSH, conferindo as propriedades biológicas dessa molécula (GILL *et al.*, 2013).

A glutaciona é um metabólito de múltiplas funções, que incluem o envolvimento no crescimento e no desenvolvimento e a modulação das respostas das plantas a uma variedade de estresses ambientais (GILL *et al.*, 2013). Algumas funções dessa molécula são: a) absorção e assimilação de enxofre na raiz; b) desintoxicação celular, através de sua conjugação a compostos xenobióticos; c) síntese de fitoquelatinas; d) eliminação de ROS, de forma direta ou indireta (como substratos de enzimas antioxidantes e atuando no ciclo ascorbato-glutaciona); e) controle do estado redox celular, em conjunto com o ascorbato (OZTETIK, 2008; AHMAD *et al.*, 2010; FOYER; NOCTOR, 2011).

Para a biossíntese da glutaciona, os aminoácidos constituintes são unidos em dois passos dependentes de ATP; o primeiro deles, catalisado pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase (γ -ECS), formando γ -glutamilcisteína e o segundo, catalisado pela glutaciona sintetase (GSH-S), que produz GSH por meio da adição de um resíduo de glicina (GILL *et al.*, 2013).

1.3.4 Óxido nítrico

1.3.4.1 Aspectos gerais

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso com meia-vida relativamente longa, permanecendo nos sistemas vivos entre 3-5 s. É uma molécula diatômica pequena com alta difusibilidade ($4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em água) que pode atingir tanto regiões hidrofílicas (citosol), quanto regiões hidrofóbicas (bicamada lipídica das membranas) das células (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Nas plantas, a síntese de NO ocorre de diferentes maneiras. A primeira, e talvez a mais importante, dá-se pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), que converte a L-arginina em citrulina à custa de NADPH. Outra enzima envolvida na síntese de NO é a redutase do nitrato (NR) que possui função primordial de converter nitrato a nitrito para a assimilação de nitrogênio, mas pode também converter nitrito a NO, numa via dependente de NADPH, em resposta a estresse abiótico (WANG *et al.*, 2013). Por fim, a síntese de NO pode ocorrer de maneira espontânea, através da desnitrificação e da assimilação do nitrato (NO_3^-), bem como através da nitrificação do íon amônio (NH_4^+) (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

O NO é uma molécula biologicamente ativa que tem papel chave no metabolismo de plantas e animais (MISRA; MISRA; SINGH, 2011). Suas funções foram inicialmente descobertas em animais. Segundo Beligini e Lamatina (2000), o NO está envolvido em mecanismos importantes durante a neurotransmissão, vasodilatação, relaxamento muscular e regulação imunológica, dentre outros. Em plantas, essa molécula tem múltiplas funções, atuando no crescimento, no desenvolvimento e em diversos processos fisiológicos. Entretanto o NO tem sido considerado tanto citotóxico, quanto citoprotetor (QIAO; FAN, 2008). Tais efeitos nas plantas são dependentes da concentração de NO e do tecido onde ele está localizado (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011).

O uso direto do NO em estudos sobre seu papel fisiológico nas plantas tem gerado resultados ambíguos e controversos. Isso se deve, pelo menos em parte, ao fato dessa molécula ser um gás, e, em solução aquosa, não há garantia de que a concentração proposta de NO seja a mesma disponível para as plantas (FLORYSZAK-WIECZOREK *et al.*, 2006). Como alternativa, são utilizados compostos liberadores de NO, quando em solução aquosa, pois eles são capazes de induzir respostas semelhantes àsquelas mediadas pelo NO endógeno. Alguns exemplos desses compostos são o nitroprussiato de sódio (NPS), o S-nitrosoglutaciona (GSNO) e o S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

O efeito tóxico do NO parece estar envolvido com a reação entre essa molécula e o radical superóxido, que ocasiona a formação do peroxinitrito (ONOO^-), o qual em pH neutro, rapidamente sofre protonação, formando o ácido peroxinitroso (HONO_2). O HONO_2 é instável e sofre decomposição produzindo NO_2 e $\cdot\text{OH}$ ou íons NO_3^- (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007). Todos esses subprodutos podem promover efeitos tóxicos, tais como a oxidação de DNA, lipídios, tióis protéicos e grupos férricos, resultando em diminuição da atividade enzimática, além de danos celulares. Além disso, sob condições normais, o NO como radical livre pode reagir com o O_2 e se transformar em outras formas redox. Assim, a oxidação de um elétron do NO leva à formação do cátion nitrosônio (NO^+), enquanto que o produto da redução de um elétron do NO forma o radical nitroxila (NO^-) (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Nos últimos anos, progressos significativos foram feitos na descrição do papel do NO na sinalização celular em plantas. Tais progressos combinam dados farmacológicos, bioquímicos, fisiológicos e genéticos. A sinalização celular mediada por baixas concentrações de NO envolvem a biossíntese de GMP cíclico e de ADP ribose cíclica, e o aumento de Ca^{2+} citosólico (PALAVAN-UNSAL; ARISAN, 2009). Além disso, esses mesmos autores também afirmam que proteínas cinases, proteínas fosfatases, fatores de transcrição, canais iônicos e outras proteínas sinalizadoras são também moduladas por NO.

Entre os processos fisiológicos vegetais nos quais o NO está envolvido, destacam-se a promoção da germinação, a quebra da dormência de sementes, a regulação da maturação, da senescência e da regulação floral, a mediação da abertura estomática (juntamente ao ácido abscísico), o gravitropismo e as respostas aos estresses bióticos e abióticos (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007; QIAO; FAN, 2008; MISRA; MISRA; SINGH, 2011; SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011).

1.3.4.2 Aclimação a estresses mediada pelo óxido nítrico

Nas últimas décadas, a literatura científica tem evidenciado o papel do NO na tolerância de plantas a estresses bióticos e abióticos, tais como salinidade, seca, altas e baixas temperaturas, metais pesados e radiação ultravioleta (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011). Segundo Misra, Misra e Singh (2011), os estresses bióticos e abióticos induzem a atividade da NOS e NR, e a conseqüente síntese de NO no interior da célula. Essa molécula, então, atua na modulação da atividade enzimática e da expressão gênica, o que ocasiona respostas fisiológicas, por exemplo: homeostase iônica, movimento estomático, germinação,

defesa contra patógenos, gravitropismo, efeitos antioxidativos e morte celular programada (MISRA; MISRA; SINGH, 2011).

Diversos estudos têm sugerido que o NO induz a aclimação de plantas a estresses, principalmente por seu envolvimento na modulação das respostas antioxidativas (QIAO; FAN, 2008; MISRA; MISRA; SINGH, 2011; SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011). Como mencionado anteriormente, os estresses ambientais influenciam a homeostase celular, por induzir o desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS, o que leva à destruição oxidativa da célula. O NO parece estar relacionado com a manutenção de baixos níveis de ROS, com o aumento da atividade das enzimas antioxidativas e dos compostos antioxidantes não enzimáticos. Além disso, o NO parece também ativar a expressão dos genes relacionados à defesa antioxidativa (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011).

Em adição aos efeitos antioxidativos, o NO parece também induzir a aclimação de plantas a estresses, especialmente a salinidade, por promover a germinação e a mobilização de reservas (KOPYRA; GWÓZDZ, 2003; HUA *et al.*, 2003; SARATH *et al.*, 2006; SILVA, 2007; HU *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010; ZERLIN, 2011; EGBICHI *et al.*, 2014), o crescimento e o desenvolvimento das plântulas (GOUVÊA *et al.*, 1997; KOPYRA & GWÓZDZ, 2003; BETHKE *et al.*, 2004; CORREA-ARAGUNDE *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2005; BOHM *et al.*, 2010; ZERLIN, 2011; LIN *et al.*, 2012), bem como contribuir para um melhor balanço entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio (SIDDIQUI *et al.*, 2009); e por diminuir o acúmulo de íons tóxicos às células (Na^+ e Cl^-), aumentando a relação K^+/Na^+ , e conseqüentemente, melhorando a homeostase iônica (ZHAO *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2012). Além disso, o NO promove a fotossíntese sob condições de estresse salino, através da indução de pigmentos fotossintéticos, da síntese de ATP e de duas vias de transporte de elétrons na mitocôndria (YAMASAKI *et al.*, 2001; ZOTTINI *et al.*, 2002; RUAN *et al.*, 2002; FAN *et al.*, 2007; GONDIM *et al.*, 2013).

2. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Inicialmente, foi feito um experimento preliminar (Experimento I), que teve como principal objetivo determinar a concentração de NPS para o pré-tratamento das sementes de pinhão-mansão por 24 h, que minimizasse os efeitos deletérios do estresse salino (NaCl a 100 mM) na germinação e no crescimento inicial das plântulas. Para avaliar os efeitos do pré-tratamento com NPS a 50, 75, 100 e 200 μ M na germinação, sendo o pré-tratamento com água o controle do pré-tratamento, foram determinadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo medido de germinação. Já os efeitos do pré-tratamento no crescimento foram estimados através dos comprimentos da parte aérea e radícula e das matérias secas do endosperma e eixo embrionário, aos oito dias após o pré-tratamento (DAPT). Em paralelo, também nesse experimento, foram determinados os teores dos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Com exceção dos testes de germinação, todas as análises foram feitas em plântulas ao final de oito dias após o pré-tratamento das sementes com o NPS e semeadas em água destilada (controle) ou em solução de NaCl a 100 mM (tratamento salino).

Estabelecida a melhor concentração de NPS para o pré-tratamento das sementes, foi realizado um segundo experimento (Experimento II), o qual teve por finalidade confirmar os resultados observados no Experimento I e ampliar os estudos sobre os efeitos desse pré-tratamento na fisiologia e na bioquímica das plântulas de pinhão-mansão sob condições de estresse salino. Com exceção dos testes de germinação e da análise da expressão gênica, todas as outras variáveis foram determinados aos 2, 4, 6 e 8 DAPT, incluindo: medidas de crescimento (comprimento da parte aérea e da radícula e matéria seca do endosperma e do eixo embrionário); teor de peróxido de hidrogênio; teor de TABRS; atividades das enzimas antioxidativas: SOD, CAT, APX, GPX E GR; teores dos antioxidantes não enzimáticos: ascorbato e glutathiona.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de germinação

As sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) foram provenientes de plantas cultivadas em área experimental da UEPB, no campus de Lagoa Seca-PB, obtidas da seleção FT-2 da Fazenda Tamanduá em Catingueira, Paraíba. Os testes de germinação, bem como as análises químicas e bioquímicas, foram realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Para a germinação, as sementes foram inicialmente desinfestadas com o fungicida Orthocid a 2%, por 10 min. Em seguida, elas foram lavadas exaustivamente com água corrente e depois com água destilada para total retirada dos resíduos. Logo após esse tratamento, as sementes, em número de 20, foram dispostas uniformemente sobre três folhas de papel germitest (37 cm x 28 cm), previamente esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 15 min. As folhas de papel foram umedecidas com água destilada (pré-tratamento com água) ou com soluções de NPS a 50, 75, 100 e 200 µM, no Experimento I; e na concentração única de 75 µM, no Experimento II (pré-tratamento com NPS), e nessa situação permaneceram por um período de 24 h. Passado esse tempo, as sementes foram transferidas para folhas de papel germitest umedecidas com água destilada (condição controle) ou com NaCl a 100 mM (tratamento salino). Tanto no pré-tratamento das sementes, como na etapa de germinação e crescimento inicial das plantas, o volume da solução para umedecer o papel foi igual a três vezes a massa do papel. Posteriormente à distribuição das sementes nas folhas de papel germitest, estas foram enroladas e deixadas em vasos de polietileno de 3 L cobertos com sacos plásticos transparentes (em média, 10 rolos por vaso). Os vasos contendo os rolos foram mantidos em estufa tipo B.O.D. ajustada à temperatura de 30 °C, sob fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Os dois experimentos foram conduzidos com cinco repetições, cada uma correspondendo a um rolo de papel contendo 20 sementes.

3.2 Testes de germinação

Para os testes de germinação, foram consideradas germinadas, as sementes cuja radícula fosse igual ou superior a 2 mm de comprimento. Nesses testes, foram analisadas as seguintes variáveis:

- **Índice de velocidade de germinação (IVG)**, o qual foi determinado de acordo com a fórmula abaixo, segundo Maguire (1962), sendo as análises feitas ao final de oito dias após o pré-tratamento (DAPT) das sementes.

$$\text{IVG} = (G1 / N1) + (G2 / N2) + (G3 / N3) + \dots + (Gn / Nn), \text{ no qual:}$$

G1, G2, G3 e Gn = número de sementes nas primeira, segunda, terceira e última contagem de germinação;

N1, N2, Nn = número de dias após o pré-tratamento nas primeira, segunda, terceira e última contagem de germinação.

- **Tempo médio de germinação (TMG)**, o qual foi determinado de acordo com a fórmula abaixo, segundo Laboriau (1983), sendo as análises feitas ao final de oito dias após o pré-tratamento (DAPT) das sementes.

$$\text{TMG} = \sum (n_i \cdot t_i) / \sum n_i, \text{ no qual:}$$

n_i = número de sementes germinadas entre cada intervalo de tempo de contagem;

t_i = tempo decorrido entre o início da germinação e a i -ésima contagem.

- **Porcentagem de germinação**, a qual foi determinada de acordo com a fórmula abaixo, segundo Laboriau (1983), com contagens diárias de germinação.

$$\%G = (\sum n_i) / N \times 100 \text{ no qual:}$$

$\sum n_i$ = número total de sementes germinadas;

N = Número de sementes postas para germinar.

3.3 Medidas de comprimento e determinação da matéria seca

No caso do Experimento I, após os testes de germinação (aos 8 DAPT), as plântulas foram coletadas e, com o auxílio de uma régua, foi medido o comprimento da parte aérea e da radícula, sendo expressos em centímetros. Para a determinação da matéria seca do endosperma e do eixo embrionário, as plântulas coletadas foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 60 ± 2 °C, até obtenção de peso constante. Os resultados para essa variável foram expressos em g plântula⁻¹. No Experimento II, tais determinações foram feitas aos 2, 4, 6 e 8 DAPT. Em adição, durante a coleta do experimento II, cinco plântulas (uma de cada repetição) foram separadas, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente guardadas em ultrafreezer a -80 °C, a fim de serem utilizadas nas análises de expressão gênica.

3.4 Teores de íons inorgânicos

Foram determinados os teores de Na⁺, K⁺ e cloreto (Cl⁻), sendo os dois primeiros no Experimento I e os três no Experimento II. Enquanto que no Experimento I, tais determinações foram feitas apenas ao final dos 8 DAPT, no outro experimento, tais determinações foram feitas aos 2, 4, 6 e 8 DAPT.

Para preparação dos extratos para determinação dos teores dos íons inorgânicos, 50 mg de matéria seca dos tecidos (endosperma ou eixo embrionário) foram homogeneizados com 5 mL de água desionizada, em tubos de ensaio, sendo estes mantidos em banho-maria a 45 °C, durante 1 h, com agitações a cada 15 min. Passado esse tempo, os tubos foram centrifugados a 3.000 x g, por 15 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e armazenado no freezer a -25 °C até sua utilização, sendo o precipitado descartado.

Os teores de Na⁺ e K⁺ foram determinados segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1989), com o auxílio de um fotômetro de chama (Micronal®, modelo B462). Para cada extrato, foram feitas duas leituras no fotômetro de chama, sendo os teores dos íons Na⁺ e K⁺ expressos em µmol g⁻¹ de matéria seca (MS).

Os teores de Cl⁻ foram estimados de acordo com Gaines, Parker e Gascho (1984). Para a reação, em tubos de ensaio adicionaram-se 1,0 mL do extrato aquoso, convenientemente diluído, e 167 µL da mistura da reação, formada por tiocianato de mercúrio [Hg(SCN)₂] a 13,2 mM em metanol a 100% e nitrato férrico [Fe(NO₃)₃] a 20,2% (p/v) em água deionizada, na proporção 4:1, respectivamente. Os tubos, após serem agitados, permaneceram em repouso por 15 min. Os teores de Cl⁻ foram quantificados pelas leituras de absorbância em 460 nm. Como branco da reação, utilizou-se um tubo contendo água desionizada, ao invés do extrato, e os demais componentes do meio de reação, sendo utilizada uma solução de NaCl como padrão. Cada extrato foi dosado em duplicata. Os teores de Cl⁻ foram expressos em µmol g⁻¹ de MS.

3.5 Peroxidação lipídica

3.5.1 Preparação do extrato

O extrato para estimativa da peroxidação lipídica foi obtido pela maceração de 250 mg dos tecidos frescos de endosperma e eixo embrionário com 3,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Logo após isso, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, por 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado nas análises.

3.5.2 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi determinada através da quantificação dos teores de TBARS, conforme Heath e Packer (1968). Para isso, 500 μL de extrato, convenientemente diluído, foram postos para reagir com 500 μL da solução de em ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5%, preparado em ácido tricloroacético (TCA) a 20%. Essa mistura foi aquecida por 30 min, a 95 °C, sendo a reação interrompida por seu resfriamento em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g, durante 10 min. As leituras espectrofotométricas do sobrenadante foram realizadas em 532 e 600 nm. Esses teores foram estimados através da subtração entre as leituras de absorvância específica (532 nm) e não-específica (600 nm) e utilizando o coeficiente de extinção molar do TBARS ($\epsilon = 0,155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em nmol de TBARS g^{-1} de matéria fresca (MF). No Experimento I, essas determinações foram feitas apenas ao final dos 8 DAPT, enquanto no Experimento II tais determinações foram feitas aos 2, 4, 6 e 8 DAPT.

3.6 Delineamento experimental e análise estatística do Experimento I

Nesse experimento, o delineamento foi o inteiramente casualizado e seguiu um esquema fatorial 2 x 5, sendo duas condições de semeadura [em água destilada (controle) ou em solução de NaCl a 100 mM (tratamento salino)] e cinco concentrações de NPS para o pré-tratamento das sementes (0, 50, 75, 100 e 200 μM). Cada tratamento foi composto por cinco repetições de 20 sementes. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar a significância entre os fatores, usando-se o teste F. Quando a diferença foi significativa ($p \leq 0,05$), o teste de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios, usando-se o programa SISVAR (versão 5.3). Os gráficos foram feitos utilizando o programa Sigma Plot [version 11.0 (SYSTAT Software, Inc.)].

3.7 Determinação dos teores de peróxido de hidrogênio

A determinação dos teores de H_2O_2 , bem como todas as análises descritas a seguir foram realizadas apenas no Experimento II e, com exceção da análise da expressão gênica, todas foram feitas aos 2, 4, 6 e 8 DAPT. O extrato foi preparado como descrito no item 3.5.1.

Os teores de H₂O₂ foram determinados como descrito por Gay *et al.* (1999), com algumas modificações. A 100 µL da amostra foram adicionados 500 µL de uma solução contendo FeSO₄ a 1 mM e (NH₄)₂SO₄ a 1 mM. Após isso, foram adicionados 200 µL de H₂SO₄ a 100 mM. Passados 2 min, foram adicionados à reação 100 µL de alaranjado de xilenol a 1 mM. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 20 min à temperatura ambiente (25 °C), sendo, em seguida, realizadas leituras de absorvância em 560 nm. O teor de H₂O₂ foi calculado a partir de uma curva padrão com concentrações crescentes de H₂O₂ e os resultados foram expressos em µmol g⁻¹ MF.

3.8 Atividade das enzimas antioxidativas

3.8.1 Preparação do extrato enzimático

Para preparação dos extratos para a determinação da atividade das enzimas SOD, CAT, APX, GPX e GR, 0,5 g de endosperma ou 0,1 g de eixo embrionário, ambos frescos, foram homogeneizados em almofariz com 2,0 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM. Para o caso do extrato para determinação da atividade da peroxidase do ascorbato, ao tampão fosfato de extração foi adicionado ascorbato para resultar numa concentração final de 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). Em seguida, o macerado foi centrifugado a 12.000 x g, durante 15 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 °C, sendo os extratos armazenados em ultrafreezer a -80 °C até o momento das análises.

3.8.2 Dismutase do superóxido

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi mensurada de acordo com o método de Beauchamp e Fridovich (1971), que se baseia na fotorredução do azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT) através da produção de azul de formazana, com leituras de absorvância em 560 nm. Nesta reação, definiu-se uma unidade de atividade enzimática (UA) como sendo a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT no intervalo de tempo de 15 min. A mistura de reação continha metionina a 13 mM, NBT a 75 µM, EDTA a 100 mM e riboflavina a 2 µM, todos dissolvidos em tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8. A 1.450 µL dessa solução foram adicionados 50 µL do extrato convenientemente diluído. A reação foi conduzida a 25 °C em uma câmara de reação revestida internamente com papel alumínio e iluminada com duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, por 15 min (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Os extratos foram dosados em duplicata, sendo os resultados expressos em UA mg⁻¹ proteína.

3.8.3 *Catalase*

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com Haver e McHale (1987), através do decaimento da absorvância em 240 nm, devido ao consumo de H₂O₂. O meio de reação foi composto por 1.250 µL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM, acrescido de 100 µL de H₂O₂ a 0,5 M e 150 µL do extrato convenientemente diluído. Os extratos foram dosados em duplicata, e os resultados expressos em µmol H₂O₂ mg⁻¹ proteína min⁻¹. Para os cálculos da atividade enzimática, foi usado o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.8.4 *Peroxidase do ascorbato*

A atividade da APX (EC 1.11.1.1) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), por meio do acompanhamento do decaimento da absorvância em 290 nm devido à oxidação do ascorbato. A mistura de reação foi constituída por 50 µL de ascorbato a 15 mM, 50 µL de H₂O₂ a 30 mM e 1.390 µL de tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,0. A essa mistura, foram adicionados 10 µL do extrato enzimático convenientemente diluído. Os extratos foram dosados em duplicata, sendo os resultados expressos em nmol H₂O₂ mg⁻¹ proteína min⁻¹. Para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a estequiometria da reação (dois moles de ascorbato para um mol de H₂O₂).

3.8.5 *Peroxidase do guaiacol*

A atividade da GPX (EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976) mediante o acompanhamento do aumento da absorvância em 420 nm devido à formação do tetraguaiacol. O meio de reação foi composto por 50 µL de extrato convenientemente diluído, 950 µL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, 500 µL de guaiacol a 0,02 M e 500 µL de H₂O₂ a 60 mM. Os extratos foram dosados em duplicata, e os resultados expressos em nmol H₂O₂ mg⁻¹ proteína min⁻¹, usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a estequiometria da reação (cada mol de tetraguaiacol envolve o consumo de quatro moles de H₂O₂).

3.8.6 *Redutase da glutatona*

A atividade da GR (EC 1.6.4.2) foi determinada conforme metodologia descrita por Foyer e Halliwell (1976), com algumas modificações. A mistura de reação (volume final de 1,0 mL) consistiu de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,8; EDTA a 0,1 mM; NADPH a

0,05 mM, GSSG a 3,0 mM e 50 μL de extrato enzimático convenientemente diluído. A reação foi iniciada pela adição de NADPH ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorvância em 340 nm em espectrofotômetro. Os extratos foram dosados em duplicata e a atividade da GR foi estimada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo expressa em $\text{nmol NADPH mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

3.9 Concentração de proteína solúvel

A concentração de proteínas solúveis, necessária para o cálculo da atividade específica das enzimas antioxidativas, foi determinada nos extratos enzimáticos (item 3.8.1.), utilizando o reagente do Coomassie (BRADFORD, 1976). A reação consistiu da adição de 1,0 mL desse reagente, composto por azul de coomassie brilhante G-250 a 0,01%, etanol a 4,75% e ácido fosfórico (H_3PO_4) a 8,5%, à 100 μL do extrato convenientemente diluído. A mistura foi deixada em repouso por 15 min, sendo então submetidas à leitura de absorvância em 595 nm. Como padrão, foi utilizada a albumina de soro bovina.

3.10 Antioxidantes não enzimáticos: ascorbato e glutathione

O extrato para determinação dos teores dos antioxidantes não enzimáticos, ascorbato e glutathione, foi feito como descrito no item 3.5.1.

3.10.1 Teores de ascorbato e estado redox

Os teores de ascorbato reduzido (AsA) e ascorbato total [AsA + DHA] foram determinados de acordo com Law, Charles e Halliwell (1983). Essas análises foram estimadas através da redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} pelo ascorbato, em meio ácido, e da consequente formação de um complexo entre o Fe^{2+} e o bipyridil, resultando em uma coloração rósea, que absorve luz no comprimento de 525 nm.

Para a determinação do AsA, o meio de reação foi composto de 200 μL do extrato; 200 μL de tampão fosfato de potássio a 150 mM, pH 7,4; 200 μL de água destilada; 400 μL de TCA a 10%; 400 μL de H_2PO_4 a 44%; 400 μL de bipyridil a 4%, dissolvido em etanol a 70%, e 200 μL de FeCl_3 a 3%. Após uma rápida agitação, os tubos de ensaio contendo a mistura de reação foram incubados em banho-maria a 42 $^\circ\text{C}$, por 40 min. Passado esse tempo, a reação foi interrompida por resfriamento das amostras em banho de gelo.

O ascorbato total foi determinado após a redução do DHA pelo ditioneitol (DTT), seguindo o mesmo procedimento para determinação do AsA. O meio de reação continha 200 μL de extrato, 200 μL de tampão fosfato de potássio a 150 mM, pH 7,4, 100 μL de DTT a 10 mM mantidos, inicialmente, em banho-maria a 42 °C por 15 min. Em seguida, adicionaram-se 100 μL de N-etilmaleiamida (NEM) a 90,5% e aguardou-se o tempo de 2 min para então acrescentar os demais reagentes: 400 μL de TCA a 10%, 400 μL de H_2PO_4 a 44%, 400 μL de biperidil a 4%, em etanol a 70% e 200 μL de FeCl_3 a 3%. A cada novo componente adicionado houve uma agitação vigorosa. Após a adição de todos os integrantes da mistura, os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 42 °C, por 40 min, os quais tiveram sua reação interrompida, posteriormente, por resfriamento em banho de gelo.

Nas duas determinações, teve-se como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de ácido ascórbico (LAW; CHARLES; HALLIWEL, 1983). O DHA foi determinado através da subtração dos valores do ascorbato total e AsA. Os extratos foram dosados em duplicata e os dados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O estado redox do ascorbato foi estabelecido através da razão entre o AsA e o ascorbato total [$\text{AsA}/(\text{AsA} + \text{DHA})$] e expresso em porcentagem.

3.10.2 Teores de glutathione e seu estado redox

Os teores de GSH e glutathione total [GSH + GSSG] foram determinados como descrito por Griffith (1980). Para estimar o conteúdo de GSH, 100 μL de extrato, 1.300 μL de tampão fosfato de sódio a 150 mM, pH 7,4, inicialmente incubados a 30 °C, por 15 min, foram postos para reagir com 100 μL de 5,5 ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) a 6 mM. A mistura final foi agitada e mantida em banho-maria a 30 °C por 15 min. Passado esse tempo, a reação foi interrompida por resfriamento em banho de gelo. O teor de GSH foi estimado através de leituras de absorvância em 412 nm e usando o coeficiente de extinção molar do ácido nitrobenzóico produzido na reação ($\epsilon = 14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

Para estimar o conteúdo de glutathione total, a GSSG foi reduzida a GSH pela ação da enzima GR. Tal reação era constituída por 100 μL de extrato, 300 μL de tampão fosfato de sódio a 150 mM, pH 7,4, 500 μL de uma unidade da enzima GR (estoque: 3 mg mL^{-1} e 147 U mL^{-1}), 500 μL de NADPH a 0,3 mM e 100 μL DTNB a 6 mM, ambos dissolvidos em tampão. Os tubos de ensaio, contendo a mistura de reação, foram agitados e deixados em banho-maria

a 30 °C, por 15 min, os quais tiveram sua reação interrompida por resfriamento em banho de gelo. O teor de glutathiona total foi estimado como descrito anteriormente para a GSH.

A GSSG foi determinada através da subtração dos valores de glutathiona total e GSH. Os extratos foram dosados em duplicata e os dados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O estado redox da glutathiona foi estabelecido através da razão entre a GSH e a glutathiona total [GSH/(GSH+ GSSG)] e expresso em porcentagem.

3.11 Análise da expressão dos genes da catalase e da redutase da glutathiona

A partir da análise dos dados sobre as atividades das enzimas antioxidativas, foram selecionadas para estudo da expressão gênica as enzimas catalase e redutase da glutathiona. Essas enzimas e suas isoformas tiveram sua expressão gênica analisada pela reação da transcriptase reversa (RT), seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

O RNA total foi extraído de eixos embrionários de plântulas de pinhão-mansão com 1, 2, 4, 6 e 8 DAPT, utilizando-se de kits de extração adequados. Os genes alvo corresponderam a três isoformas da catalase (CAT1, CAT2 e CAT3) e duas isoformas da redutase da glutathiona (GR1, GR2), selecionados em pesquisas em bancos de dados para *Jatropha curcas*. Vários genes constitutivos foram testados, a fim de normalizar os dados de expressão gênica, sendo utilizados os genes ACT11, MPK4 e GADPH, por apresentarem expressão mais estável em todos os tratamentos.

3.11.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os *primers* constitutivos testados foram gentilmente cedidos pela Dra. Nara Lídia Mendes de Alencar, do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Ceará (IFCE), campus Crateús, Ceará. Estes foram adquiridos para seus experimentos de Tese de Doutorado em Bioquímica na Universidade Federal do Ceará (UFC), e haviam sido desenhados por Rocha *et al.* (2013), ambos trabalhando com pinhão-mansão. Para o presente estudo, foram desenhados os *primers* da CAT1, CAT2, CAT3, GR1 e GR2 nas junções éxon-éxon, usando o programa *Perl primer v.1.1.20* (MARSHAL, 2004). As sequências desses *primers* são mostradas na tabela 2.

3.11.2 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído de amostras contendo eixos embrionários submetidos aos tratamentos já descritos no item 2.1.1. Tendo em vista o fato de o pinhão-mansão ser uma

oleaginosa foi utilizada a associação de dois kits de extração, o primeiro com finalidade de retirada dos lipídios e extração dos ácidos nucleicos e o segundo com o intuito de purificar o RNA total. Para isso, 200 mg de matéria fresca foram maceradas com nitrogênio líquido, com o auxílio de almofariz e pistilo. O macerado foi utilizado para a extração com o reagente *Plant RNA purification reagent* (Invitrogen) e, em seguida, foi realizada a segunda etapa de extração, com a utilização do *RNeasy plant mini Kit* (Qiagen), sendo ambas as extrações feitas seguindo as instruções dos fabricantes. Uma DNase livre de RNase (Promega, Estados Unidos) foi adicionada entre as extrações, a fim de evitar a contaminação por DNA genômico nos ensaios de RT-qPCR.

3.11.3 Quantificação e análise da pureza do RNA total

Após o processo de extração e purificação do RNA, alíquotas de 1 µL das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) com leituras de absorvância em 260 nm. Para estimar a pureza do RNA extraído, as razões 260/280 e 260/230 foram mensuradas, a fim de identificar contaminações por proteínas (razão 260/280 deve estar entre 1,8 e 2,0) ou polissacarídeos (razão 260/230 deve estar acima de 2,0).

3.11.4 Análise da integridade do RNA total

A integridade do RNA total foi determinada através de eletroforese unidimensional em gel de agarose a 1,0%, utilizando 0,5 µg de RNA total. A cuba eletroforética foi preenchida com tampão MOPS 10X e ligada a uma fonte que mantinha a voltagem constante em 70 V. Às amostras foi adicionado o corante Gel RED 6X, que absorve luz no comprimento de onda que corresponde ao ultravioleta. A visualização das bandas de RNA ribossomal (18S e 28S) foi possível pela exposição do gel a um transiluminador de luz UV, e fotodocumentado por meio do sistema Mini BIS Pro (Bio-Imaging Systems), com auxílio do software Gel Capture™.

3.11.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Alíquotas equivalentes a 1 µg do RNA total foram utilizadas para a síntese do DNA complementar (cDNA). Para isso, utilizou-se do kit da IMpromII™ Transcriptase Reverse (Promega, Estados Unidos), conforme as instruções do fabricante. Os constituintes da reação, bem como seus volumes, são apresentados na Tabela 3. A solução formada (volume final de 20 µL) foi levada ao termociclador, no qual a reação de síntese do cDNA ocorreu a 65 °C, por 1 min, seguido de 42 °C, por 1 hora, e 75 °C por 15 min. O cDNA obtido foi diluído 20x e armazenado a -20 °C para as posteriores reações de qPCR.

Tabela 2- Lista dos genes utilizados nas análises de RT-qPCR seus respectivos produtos gênicos e sequências de *primers*. As letras F (forward) e R (reverse) se referem aos sentidos senso e antisenso, respectivamente.

<i>Primers</i>	Produto gênico	Sequências
ACT11*	Actin11	(F) CTAAAGGCTAATGGGGAAAC (R) CAACCACTTGATTAGAAGCC
GADPH*	Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase	(F) TGGTTGATCTCACTGTTAGG (R) AGACTCCTCTTTGATCGCAG
MPK4*	MAP cinase 4	(F) GAGCATAACATCAGAGGAATACC (R)TACGGCAGCACAAACAATACCA
CAT1	Catalase I	(F) CCGTCTTGGACCTAACTATCTA (R) GTATCACACACTTCTCACGCT
CAT2	Catalase II	(F) GATCCAGAGGTCCAATTCTG (R) AATCCGCACAAGTGAGATG
CAT3	Catalase III	(F) CCTTACAAGCACTGTCCATCG (R) GTGATAGTCTTCAAGGAGGATC
GR1	Glutationa redutase I	(F) GCCGTGGAAAGATTGTAGAC (R) GCAGCATCCGAATCAATCACA
GR2	Glutationa redutase II	(F) GGTGATATTGAGGATGCCAGG (R) CTCCCGCATTAGATAGTAACCG

**Primers* constitutivos

Tabela 3- Componentes da reação de síntese do DNA complementar (cDNA) e seus respectivos volumes.

Reagentes	Volumes (μL)
RNA total	Volume equivalente a 1 μg do RNA total
Tampão 5X	4 μL
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 μL
dNTPs (10 mM)	1,0 μL
OligodT24 (20 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	1,5 μL
H ₂ O livre de RNase	Em função do volume do RNA total
Transcriptase reversa (160 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1 μL

3.11.6 PCR semiquantitativa

A qualidade do cDNA foi analisada através da reação de PCR semiquantitativa. Para tal, utilizou-se de um par de *primers*, pertencentes ao gene da fosfatase proteica 2A2 (PP2 α). Os constituintes da reação, bem como os seus volumes são mostrados na Tabela 4, tendo a solução um volume final de 25 μL . A amplificação foi realizada em termociclador, utilizando-se um programa com uma etapa inicial de pré-desnaturação a 92 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 1 min, a 94 °C, 1 minuto, a 55 °C, e 25 s, a 72 °C. A visualização dos produtos dessa PCR semiquantitativa foi possível através de gel de agarose a 1%, similarmente como descrito no item 3.11.4, com exceção do tampão de corrida, que neste caso foi o TBE.

3.11.7 qPCR

As análises de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas utilizando o termociclador *Mastercycler ep realplex 4S* (Eppendorf®), na placa *Eppendorf white* de 150 μL com 96 poços, no qual as amostras foram analisadas em triplicata. As condições da reação foram as seguintes: 95 °C, por 10 min, seguidos de 40 ciclos que correspondiam a três fases: a primeira, de desnaturação da fita dupla do DNA (95 °C por 15 s); a segunda, de anelamento dos

Tabela 4. Componentes da PCR semiquantitativa, e seus respectivos volumes.

Reagentes	Volumes (μL)
cDNA	1 μL
Tampão 5X	5 μL
dNTPs (10 mM)	0,5 μL
Primers (senso e anti-senso)	1,0 μL (cada)
H ₂ O livre de RNAses	16,4 μL
GoTaqDNA polimerase (Promega®)	0,1 μL

iniciadores (temperatura ótima de cada *primer*, por 15 s); e por fim, a terceira, de extensão da nova fita de DNA (60 °C por 20 s). Ao final dos 40 ciclos, também foi feita a curva de dissociação (*Melting*), que consistiu de 15 s de incubação a 95 °C, 15 s de incubação a 60 °C e uma subida a 95 °C, por 15 s (SARAIVA, 2013).

As reações foram realizadas de acordo com as normas do fabricante do kit *Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)*. Cada poço da placa correspondia a uma reação composta por 10 μL do reagente *Power SYBR Green*, 4 μL de cDNA (100 ng), previamente produzido, como descrito anteriormente, 1 μL de cada oligonucleotídeo iniciador (senso e antisense) em uma concentração de 300 ng/ μL , e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada e livre de nucleases, totalizando 20 μL de reação. O monitoramento em tempo real foi realizado através da detecção dos níveis de fluorescência do SYBR Green.

Inicialmente, construiu-se um gradiente de temperatura, a fim de determinar a temperatura ótima de anelamento de cada *primer*. Para isso, utilizou-se um *pool* das amostras de cDNA. O procedimento realizado foi o mesmo descrito anteriormente, porém a fase de anelamento teve temperaturas variáveis: 47,2; 50,5; 52,7; 55,0; 57,5; 59,8; 61,9; 63,6 e 65,0°C.

A análise dos dados obtidos por RT-qPCR foram determinados pelo Ct (*Cycle threshold*) das amostras, ou seja, pelo número de ciclos de amplificação necessários para a emissão da fluorescência ultrapassar um limiar. Essa medida é realizada durante a fase exponencial da

reação de PCR. Os Cts utilizados para as análises foram obtidos através da média aritmética entre as triplicatas das reações, para cada condição e gene. A normalização dos resultados foi realizada com o auxílio do programa GeNorm (VAMDESOMPELE *et al.*, 2002). Para isso, foi utilizada a equação $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{controle endógeno})$. Os valores brutos de Ct foram convertidos em dados de expressão relativa utilizando-se o método delta Ct e delta-delta Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.12 Delineamento experimental e análise estatística do Experimento II

Nesse experimento, o delineamento foi o inteiramente casualizado e seguiu um esquema fatorial 2 x 2, constando de dois pré-tratamentos das sementes (com água destilada e com NPS a 75 μM) e de duas condições de semeadura (em água destilada e em solução de NaCl a 100 mM). Foram 5 repetições, sendo cada parcela constituída de 20 sementes. Os resultados, excetuando-se os dados de expressão gênica (que não foram analisados estatisticamente), foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para avaliar a significância entre os fatores. Os resultados foram analisados individualmente em cada tempo de coleta (2, 4, 6, e 8 DAPT). Quando a diferença foi significativa ($p \leq 0,05$), o teste de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios, utilizando o programa SISVAR (versão 5.3). Os gráficos foram feitos utilizando o programa Sigma Plot [versão 11.0 (SYSTAT Software, Inc.)].

4. RESULTADOS

4.1 Experimento I

4.1.1. Germinação

Nesse experimento, os resultados do pré-tratamento das sementes de pinhão-mansão com diferentes concentrações de NPS sobre as variáveis de germinação, ao final de oito dias do pré-tratamento, são apresentados na Tabela 5. A porcentagem de germinação (%G), em geral, não foi significativamente alterada pelo estresse salino, e nem pelo pré-tratamento, com exceção do pré-tratamento com NPS a 100 μM , no qual a porcentagem de germinação foi reduzida pela salinidade. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi reduzido significativamente pela salinidade apenas nas plântulas pré-tratadas com água destilada ou com NPS a 100 μM , não se observando alterações nos outros pré-tratamentos. Já o tempo médio de germinação (TMG) foi aumentado pela salinidade em todos os pré-tratamentos analisados (Tabela 5).

As variações na %G puderam ser melhor avaliadas quando analisadas entre os dois e quatro dias após o pré-tratamento (DAPT) das sementes (Tabela 6). Como pode ser observado, aos 2 DAPT, a %G foi reduzida pela salinidade em todos os pré-tratamentos com NPS analisados; contudo, aos 3 DAPT essa redução não aconteceu no pré-tratamento com NPS a 75 μM . Já aos 4 DAPT, a redução observada na %G pela salinidade, nas sementes pré-tratadas com água destilada, em relação ao controle, foi revertida naquelas pré-tratadas com NPS em quaisquer das concentrações testadas (Tabela 6). É importante destacar que, sob condições controle, o pré-tratamento das sementes com NPS a 200 μM causou uma redução na porcentagem de germinação. Embora não tenha sido analisado estatisticamente, em geral, a %G, sob condições de estresse salino, apresentou tendência de aumento do 2º para o 4º DAPT. Além disso, tanto em condições controle como de estresse salino, independentemente do tempo de análise, as menores %G foram observadas nas sementes do pré-tratamento com NPS a 200 μM .

4.1.2. Crescimento

Para as plântulas oriundas de sementes pré-tratadas com água destilada, a matéria seca do endosperma e do eixo embrionário foi significativamente afetada pela salinidade aos 8 DAPT, tendo sido aumentada no endosperma e reduzida no eixo embrionário (Figura 2).

Tabela 5 - Porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG, em dias), de sementes de pinhão-manso pré-tratadas com água destilada ou com diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) e semeadas sob condições controle (água destilada) ou de estresse salino (NaCl a 100 mM) aos oito dias após o pré-tratamento. Para cada variável, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

Pré-tratamento	Condições	%G	IVG	TMG
H₂O	Controle	95,0 \pm 0,3 Aa	4,7 \pm 0,1 Aa	2,1 \pm 0,0 Ba
	Estresse	90,0 \pm 0,2 Aa	4,2 \pm 0,1 Ba	2,6 \pm 0,2 Aa
NPS a 50μM	Controle	93,0 \pm 0,2 Aa	4,6 \pm 0,1 Aa	2,1 \pm 0,0 Ba
	Estresse	91,0 \pm 0,3 Aa	4,2 \pm 0,2 Aa	2,6 \pm 0,2 Aa
NPS a 75μM	Controle	91,0 \pm 0,6 Aa	4,5 \pm 0,2 Aa	2,1 \pm 0,1 Ba
	Estresse	92,0 \pm 0,4 Aa	4,4 \pm 0,2 Aa	2,5 \pm 0,1 Aa
NPS a 100μM	Controle	100,0 \pm 0,0 Aa	5,0 \pm 0,0 Aa	2,0 \pm 0,0 Ba
	Estresse	85,0 \pm 0,3 Ba	4,0 \pm 0,2 Ba	2,4 \pm 0,1 Aa
NPS a 200μM	Controle	89,0 \pm 0,8 Aa	4,3 \pm 0,3 Aa	2,1 \pm 0,1 Ba
	Estresse	88,0 \pm 0,4 Aa	4,1 \pm 0,2 Aa	2,6 \pm 0,1 Aa

Tabela 6 - Porcentagem de germinação (%G) de sementes de pinhão-manso pré-tratadas com água destilada ou com diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) e semeadas sob condições controle (água destilada) ou de estresse salino (NaCl a 100 mM) aos 2, 3 e 4 dias após o pré-tratamento (DAPT). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão.

Pré-tratamento	Condições	2 DAPT	3 DAPT	4 DAPT
H₂O	Controle	92,0 \pm 3,7 Aa	96,0 \pm 2,4 Aa	96,0 \pm 2,4 Aa
	Estresse	64,0 \pm 5,0 Ba	84,0 \pm 5,0 Bb	86,0 \pm 2,4 Bb
NPS a 50μM	Controle	90,0 \pm 3,1 Aa	94,0 \pm 2,4 Aa	94,0 \pm 2,4 Aa
	Estresse	56,0 \pm 2,1 Bb	82,0 \pm 4,4 Bb	88,0 \pm 4,0 Ab
NPS a 75μM	Controle	86,0 \pm 6,7 Ab	90,0 \pm 5,4 Aa	96,0 \pm 5,4 Aa
	Estresse	66,0 \pm 4,4 Ba	90,0 \pm 8,0 Aa	94,0 \pm 5,8 Aa
NPS a 100μM	Controle	96,0 \pm 2,0 Aa	96,0 \pm 2,0 Aa	96,0 \pm 2,0 Aa
	Estresse	64,0 \pm 3,7 Ba	80,0 \pm 4 Bb	90,0 \pm 3,1 Aa
NPS a 200μM	Controle	76,0 \pm 6,7 Ac	84,0 \pm 4,1 Ab	84,0 \pm 6,1 Ab
	Estresse	60,0 \pm 3,1 Ba	74,0 \pm 4,8 Bc	84,0 \pm 4,0 Ab

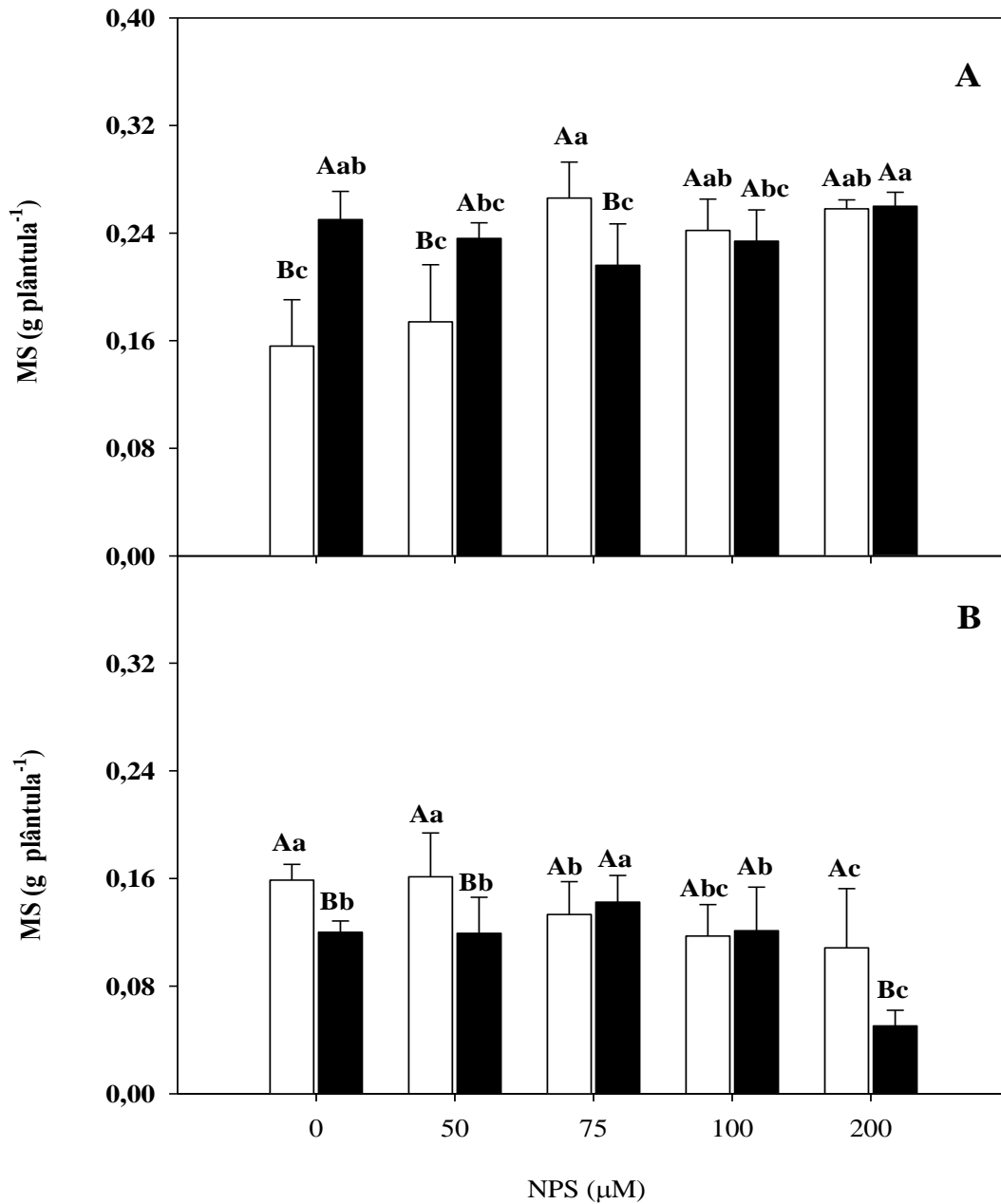


Figura 2 - Matéria seca do endosperma (A) e do eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS), e semeadas sob condições controle (□ - água destilada) ou de estresse salino (■ - NaCl a 100 mM). Em uma mesma concentração de NPS, médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si, enquanto que em um mesmo nível de salinidade, médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

No pré-tratamento com NPS a 75 μM a situação se inverteu, sendo a matéria seca do endosperma menor sob condições salinas (Figura 2A), enquanto que a do eixo embrionário foi igual àquela do controle (Figura 2B). Nos pré-tratamentos com NPS a 100 e 200 μM , a matéria seca do endosperma, sob condições de estresse, foi igual àquela do controle. É importante destacar que o eixo embrionário oriundo de sementes pré-tratadas com NPS a 200 μM apresentou, sob salinidade, maior redução na matéria seca, em relação ao controle (50%) que aquela observada no pré-tratamento com água (20%) (Figura 2B).

O comprimento das plântulas de pinhão-manso, aos 8 DAPT, foi significativamente afetado pelo estresse salino, e esse efeito variou de acordo com a concentração de NPS utilizada no pré-tratamento das sementes (Figura 3). Com exceção de plântulas oriundas de sementes do pré-tratamento com NPS a 75 μM , o comprimento da parte aérea foi reduzido pelo estresse salino (Figura 3A). Da mesma forma, o comprimento da radícula foi reduzido pela salinidade, exceto nas plântulas oriundas de sementes dos pré-tratamentos com NPS a 75 e 100 μM (Figura 3B). Portanto, no pré-tratamento com NPS a 75 μM , tanto o comprimento do eixo embrionário como o da radícula não diferiram daqueles da condição controle. Apesar do aparente benefício desse pré-tratamento, observou-se que a concentração de 200 μM de NPS foi tóxica à planta, causando reduções acentuadas de seu comprimento, tanto em condições controle como de estresse salino.

4.1.3. Íons

No endosperma, os teores de K^+ foram reduzidos pela salinidade, exceto no pré-tratamento com NPS a 75 μM , cujos teores foram semelhantes ao da condição controle (Figura 4A). As maiores reduções nos teores de K^+ , nesse mesmo órgão, ocorreram nos pré-tratamentos com NPS a 100 e 200 μM . Com exceção do pré-tratamento com NPS a 100 μM , os teores de K^+ , no eixo embrionário foram aumentados pelo tratamento salino, especialmente nas plântulas provenientes de sementes pré-tratadas com a maior dose de NPS (Figura 4B).

Os teores de Na^+ foram significativamente aumentados pela salinidade, tanto no endosperma como no eixo embrionário, fato coerente com a adição desse íon ao meio de germinação (Figura 5). Contudo, no endosperma, esse aumento devido ao estresse salino foi menor quando as plântulas foram pré-tratadas com NPS a 75 μM e 100 μM , as quais apresentaram os menores teores de Na^+ (Figura 5A). Por sua vez, no eixo embrionário das plântulas sob condições de estresse salino, o tratamento com NPS a 75 μM foi aquele em que se observou o menor teor de Na^+ (Figura 5B). Na condição controle, o teor desse

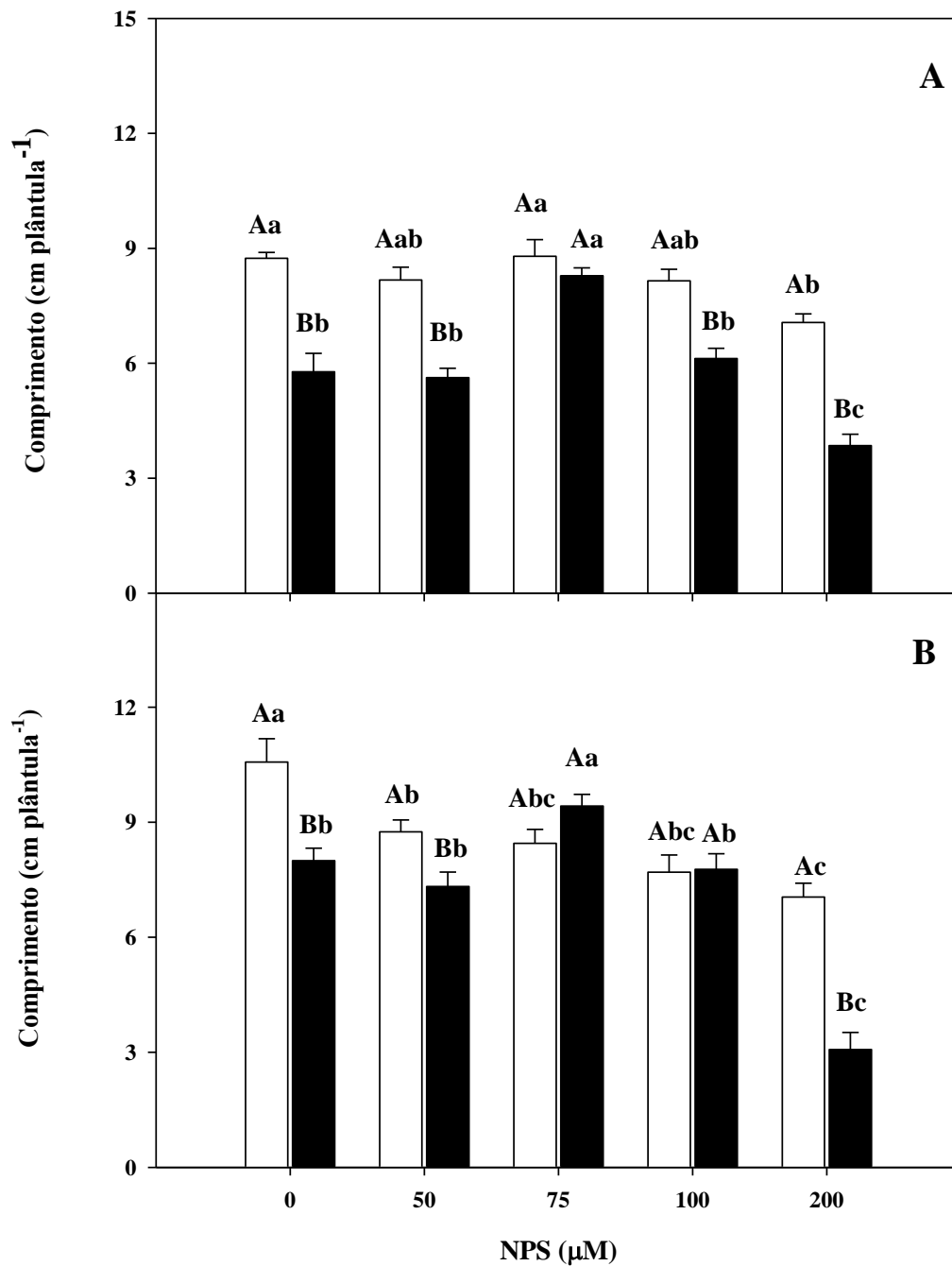


Figura 3 - Comprimento da parte aérea (A) e da radícula (B) de plântulas de pinhão-mansó aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) e semeadas sob condições controle (□ - água destilada) ou de estresse salino (■ - NaCl a 100 mM). Em uma mesma concentração de NPS, médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si, enquanto que em um mesmo nível de salinidade, médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

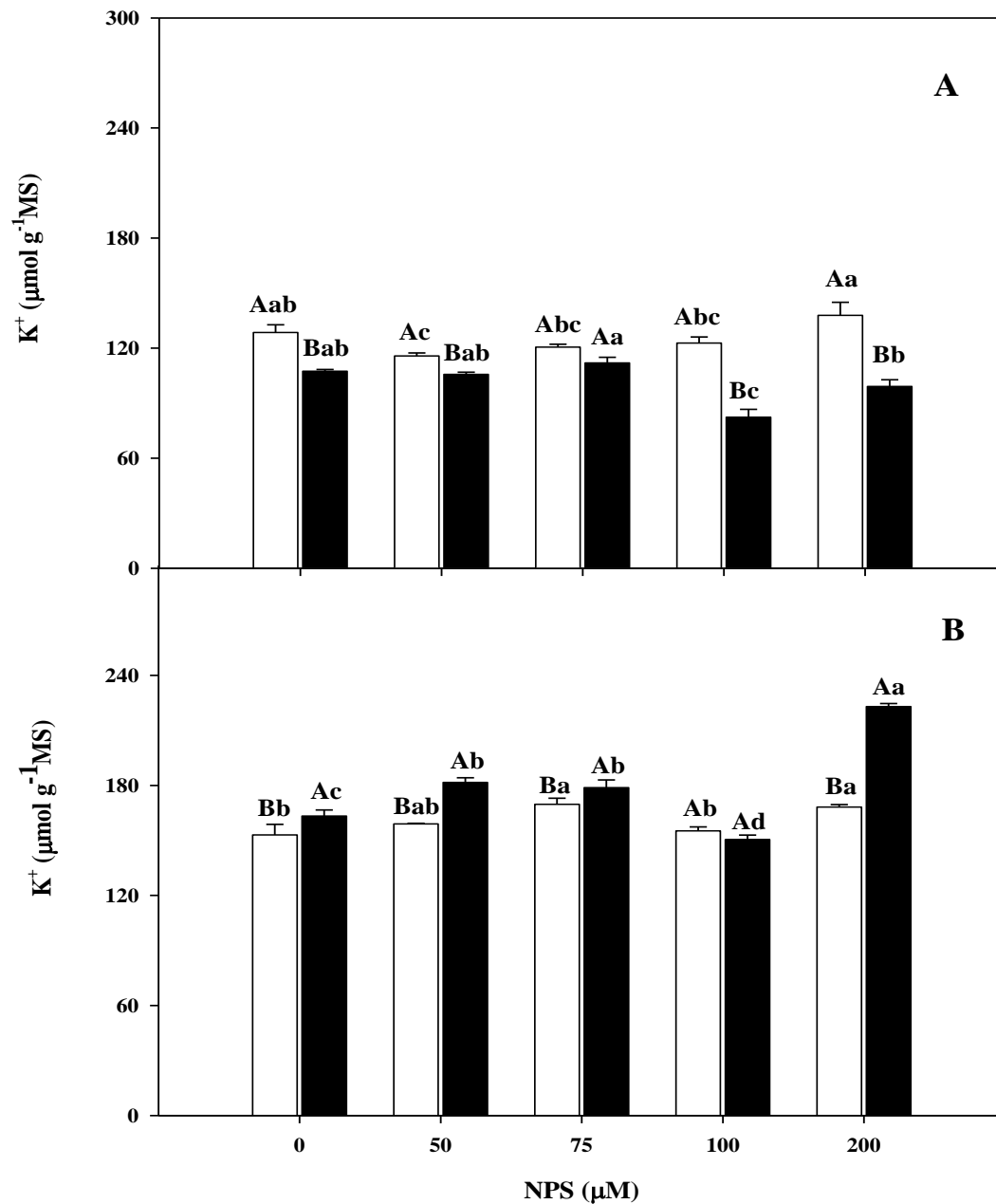


Figura 4 - Teor de potássio (K^+) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansó aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS), e semeadas sob condições controle (□ - água destilada) ou de estresse salino (■ - NaCl a 100 mM). Em uma mesma concentração de NPS, médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si, enquanto que em um mesmo nível de salinidade, médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

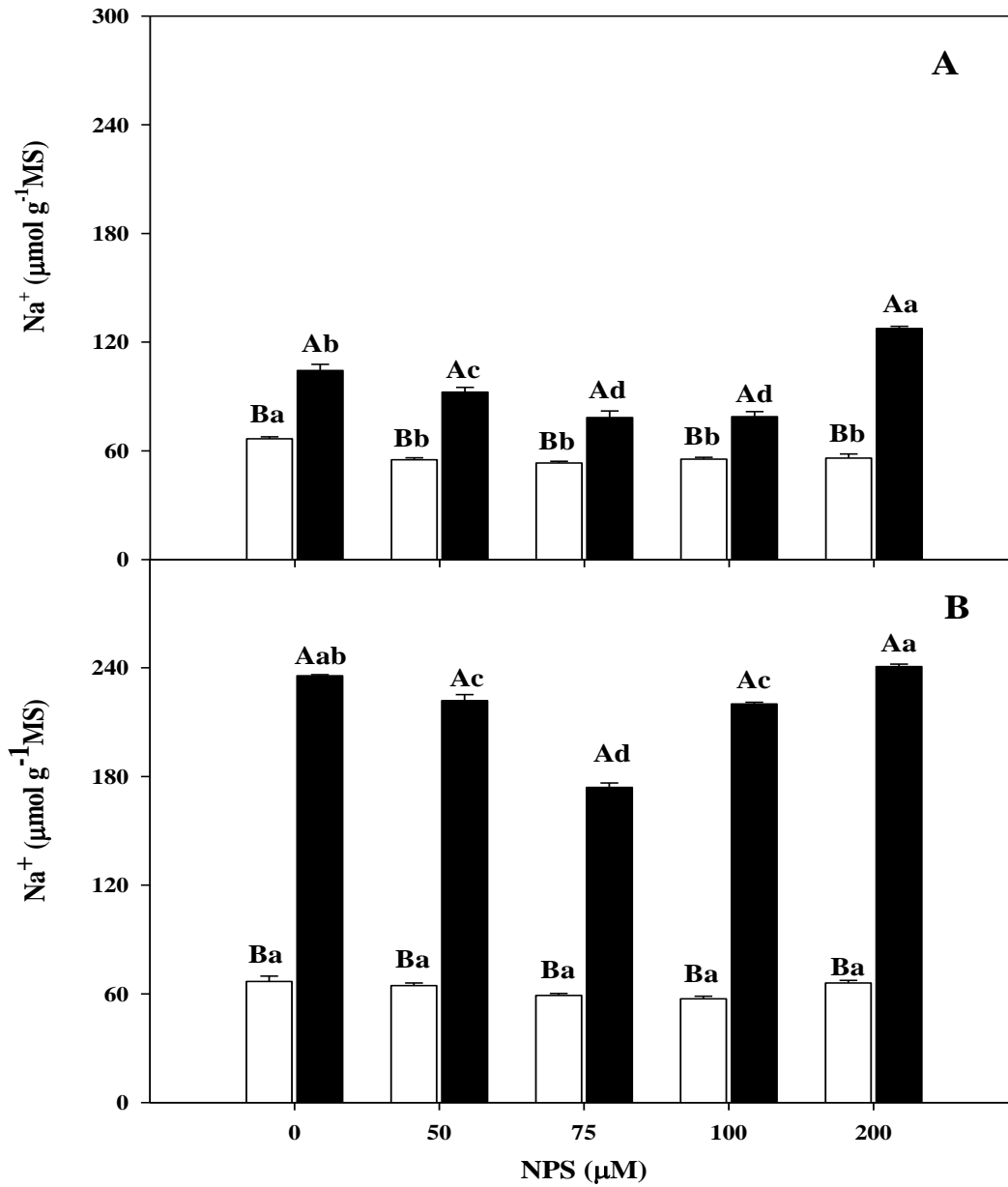


Figura 5 - Teor de sódio (Na⁺) do endosperma (A) e do eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS), e semeadas sob condições controle (□ - água destilada) ou de estresse salino (■ - NaCl a 100 mM). Em uma mesma concentração de NPS, médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si, enquanto que em um mesmo nível de salinidade, médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

íon nesse mesmo órgão não variou entre os pré-tratamentos com NPS. No pré-tratamento com NPS a 200 μM , sob condições salinas, foi onde se observou maior teor em sódio, tanto no endosperma como no eixo embrionário.

4.1.4. Peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídios, determinada através dos teores de TBARS, não foi afetada pela salinidade no endosperma das plântulas de pinhão-manso, exceto naquelas provenientes de sementes pré-tratadas com NPS a 75 μM , que apresentaram redução significativa nos teores de TBARS (Figura 6A). Já no eixo embrionário, a salinidade causou um aumento da peroxidação lipídica, em relação ao controle, quando as sementes foram pré-tratadas com água destilada (NPS a 0 μM). Contudo, nesse mesmo órgão de plântulas oriundas de sementes pré-tratadas com quaisquer das concentrações testadas de NPS, não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento salino e o controle (Figura 6B).

Dos resultados desse experimento, pôde-se constatar que, sob condições salinas, o pré-tratamento das sementes com NPS a 75 μM foi o mais eficiente na redução dos efeitos deletérios dos sais. Em suma, foi o pré-tratamento que: 1. reverteu completamente os efeitos deletérios da salinidade na %G, aos 3 DAPT, e no crescimento do eixo embrionário, aos 8 DAPT; 2. diminuiu a peroxidação lipídica no endosperma; 3. apresentou menor aumento no teor de Na^+ , sob condições de estresse salino, tanto no endosperma como no eixo embrionário. Tendo em vista isso, optou-se por essa concentração para condução no experimento II.

4.2 Experimento II

4.2.1. Germinação das sementes

Nesse experimento, as variáveis relacionadas com a germinação foram novamente analisadas, porém utilizando apenas o pré-tratamento com NPS a 75 μM , que foi a concentração que apresentou melhor resultado no experimento preliminar (Experimento I). Na Tabela 7 são apresentados os resultados sobre a %G, o IVG e o TMG, aos 8 DAPT. Como pode ser visto, a %G não foi alterada pela salinidade ou pelo pré-tratamento com NPS, enquanto o IVG e o TMG foram significativamente afetados pelos tratamentos e condições de germinação. No pré-tratamento com água destilada, o IVG foi reduzido pela salinidade em 56,8% em relação à condição controle; porém, nas sementes pré-tratadas com NPS, essa redução foi de apenas 34,3%, sendo o IVG das sementes pré-tratadas com o NPS 43,8% maior que aquele das pré-

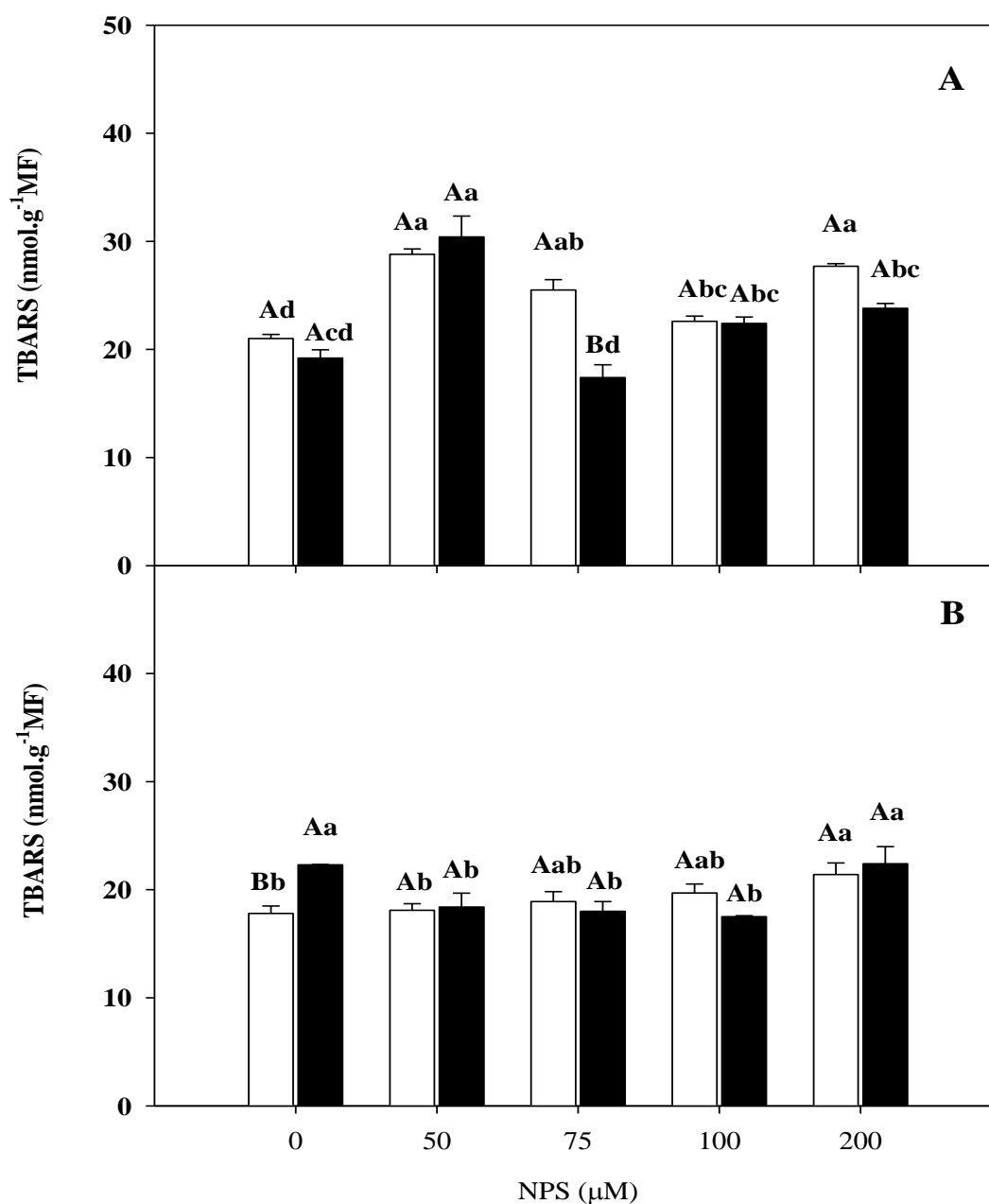


Figura 6 - Teores de TBARS do endosperma (A) e do eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos oito dias após o pré-tratamento das sementes com diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS), e semeadas sob condições controle (□ - água destilada) ou de estresse salino (■ - NaCl a 100 mM). Em uma mesma concentração de NPS, médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si, enquanto que em um mesmo nível de salinidade, médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

tratadas com água e mantidas na condição de estresse (Tabela 7). Nas condições controle, o pré-tratamento com NPS não alterou significativamente o IVG das sementes. Já o TMG foi aumentado pela salinidade, independentemente do pré-tratamento (Tabela 7). Em condições salinas, o TMG das sementes pré-tratadas com NPS foi 29,0% menor que aquele do pré-tratamento com água destilada, enquanto na condição controle não houve diferença com relação ao pré-tratamento. Em relação ao controle, a salinidade aumentou em 82,4% o TMG das sementes pré-tratadas com água destilada; porém, naquelas pré-tratadas com NPS o aumento causado pelo estresse salino foi de apenas 29,4% (Tabela 7).

Tabela 7 - Porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG, em dias) de sementes de pinhão-manso pré-tratadas com água destilada ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M e semeadas sob condições controle (água destilada) ou de estresse salino (NaCl a 100 mM) aos oito dias após o pré-tratamento. Para cada variável, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

Pré-tratamento	Condições	%G	IVG	TMG
H₂O	Controle	92,0 \pm 3,7 Aa	7,4 \pm 0,3 Aa	1,7 \pm 0,0 Ba
	Estresse	82,0 \pm 5,8 Aa	3,2 \pm 0,2 Bb	3,1 \pm 0,2 Aa
NPS	Controle	90,0 \pm 6,3 Aa	7,0 \pm 0,4 Aa	1,7 \pm 0,1 Ba
	Estresse	84,0 \pm 4,0 Aa	4,6 \pm 0,1 Ba	2,2 \pm 0,0 Ab

As diferenças nas %G das sementes de pinhão-manso em função dos tratamentos e condições de germinação se tornaram mais evidentes nos estádios iniciais de germinação. Como pode ser visto na Tabela 8, aos 2, 3 e 4 DAPT, a salinidade reduziu a %G, independentemente do pré-tratamento. Em condições controle, não foram observadas diferenças significativas na %G entre os pré-tratamentos com água destilada ou com NPS; porém, em condições de estresse salino, houve um aumento nessa variável nos três tempos analisados. Nas sementes pré-tratadas com água destilada, aos 2, 3 e 4 DAPT, as reduções na %G, causadas pelo estresse salino, foram de 46,3, 34,1 e 20,0%, respectivamente, enquanto naquelas pré-tratadas com NPS, tais reduções

foram menores, 37,8, 17,8 e 8,9%, respectivamente (Tabela 8). Em condições salinas, aos 2, 3 e 4 DAPT, as %G das sementes pré-tratadas com NPS foram 27,3, 27,6 e 13,9% maiores que aquelas pré-tratadas com água e mantidas nessas mesmas condições.

Tabela 8 - Porcentagem de germinação (%G) de sementes de pinhão-manso pré-tratadas com água destilada ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M e semeadas sob condições controle (água destilada) ou de estresse salino (NaCl a 100 mM) aos 2, 3 e 4 dias após o pré-tratamento (DAPT). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

Pré-tratamento	Condições	2 DAPT	3 DAPT	4 DAPT
H₂O	Controle	82,0 \pm 5,8 Aa	88,0 \pm 5,8 Aa	90,0 \pm 5,4 Aa
	Estresse	44,0 \pm 1,2 Bb	58,0 \pm 0,7 Bb	72,0 \pm 5,8 Bb
NPS	Controle	90,0 \pm 3,7 Aa	90,0 \pm 6,0 Aa	90,0 \pm 6,3 Aa
	Estresse	56,0 \pm 5 Ba	74,0 \pm 3,1 Ba	82,0 \pm 3,8 Ba

4.2.2. *Matéria seca e crescimento das plântulas*

A matéria seca do endosperma e do eixo embrionário das plântulas de pinhão-manso foi afetada pela salinidade e pelo pré-tratamento das sementes com NPS (Figura 7). Nas plântulas provenientes de sementes pré-tratadas com água destilada, a matéria seca do endosperma foi maior naquelas sob estresse salino, em cada um dos tempos analisados (2, 4, 6 e 8 DAPT). Entretanto, o pré-tratamento com NPS reverteu em grande parte essa situação, fazendo com que a matéria seca do endosperma ficasse com valor muito próximo daquele das plântulas na condição controle, especialmente naquelas do pré-tratamento com NPS (Figura 7A). A matéria seca do endosperma diminuiu ao longo dos DAPT avaliados, independentemente da condição de semeadura ou de pré-tratamento.

No eixo embrionário, foram observadas respostas de natureza inversa às do endosperma (Figura 7B). Nas plântulas oriundas de sementes pré-tratadas com água destilada, a salinidade

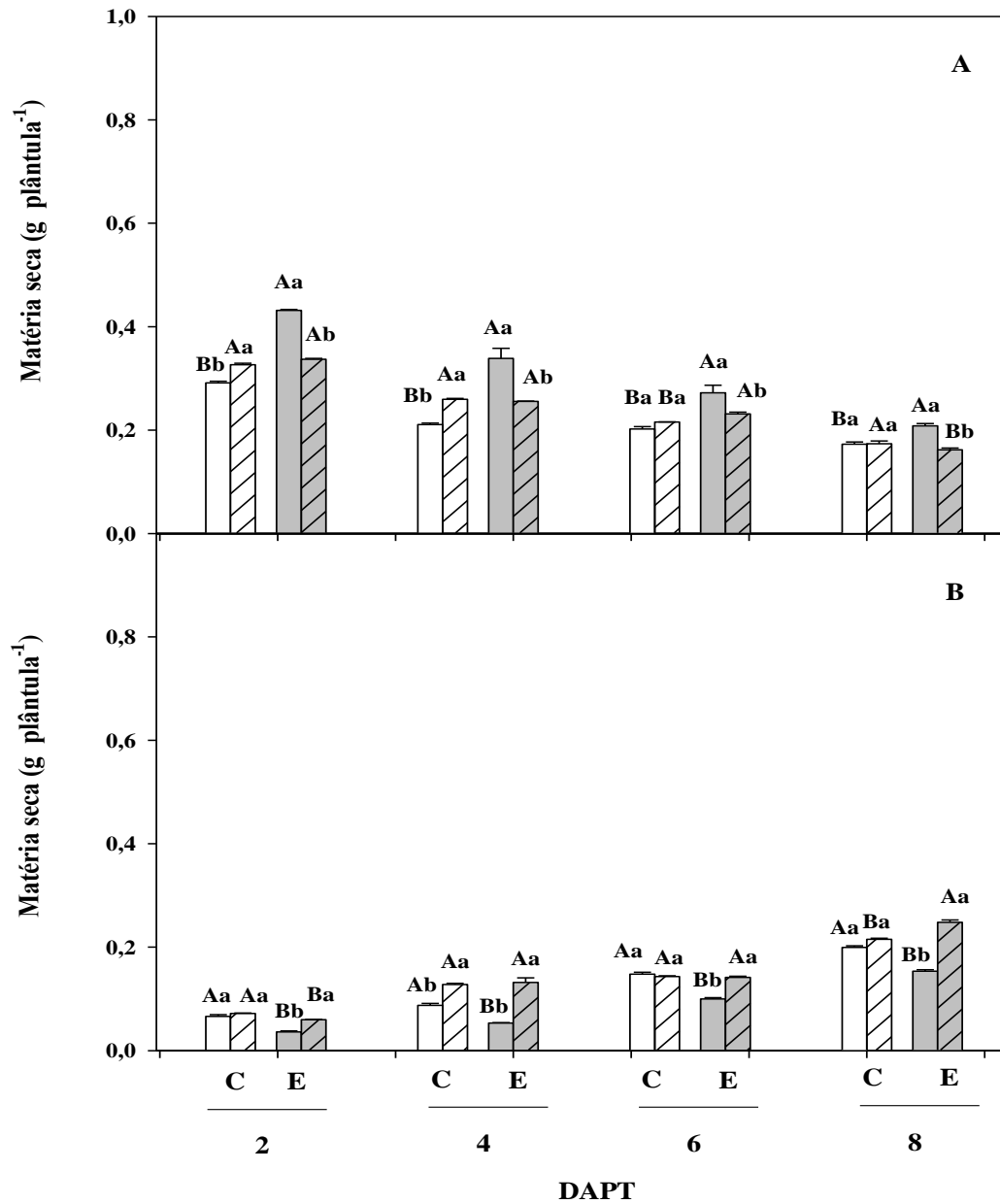


Figura 7 - Matéria seca do endosperma (A) e do eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

reduziu a matéria seca do eixo embrionário em todos os tempos analisados, porém o pré-tratamento com NPS reverteu essa situação e os valores se aproximaram daqueles da condição controle. Em condições salinas, os valores da matéria seca do eixo embrionário das plântulas do pré-tratamento com NPS foram 66, 147, 43 e 62% maiores, em relação àqueles do pré-tratamento com água destilada, aos 2, 4, 6 e 8 DAPT, respectivamente. Em condições controle, o pré-tratamento com NPS estimulou o aumento da matéria seca do eixo embrionário apenas aos 4 DAPT, mantendo-se inalterada nos outros DAPT (Figura 7B). Independentemente do tratamento e da condição de germinação, a matéria seca do eixo embrionário aumentou com o tempo de germinação (Figura 7B).

O comprimento da parte aérea do pinhão-mansão foi severamente reduzido pela salinidade nas plântulas oriundas de sementes pré-tratadas com água destilada, em relação àquelas do controle, sendo a redução, em média, de 40% (Figura 8). Entretanto, sob condições de salinidade, o pré-tratamento com NPS aumentou o comprimento da parte aérea, em relação àquelas do pré-tratamento com água destilada, em 19,4, 42,2, 36,0 e 50,8% aos 2, 4, 6 e 8 DAPT, respectivamente (Figura 8A).

Da mesma forma que aconteceu na parte aérea, o pré-tratamento com NPS também atenuou, em parte, a inibição do crescimento da radícula causada pela salinidade, sendo a redução, em média, de 45% em relação ao controle (Figura 8B). Sob condições de estresse salino, o pré-tratamento com NPS aumentou o comprimento da radícula, em relação àquelas do pré-tratamento com água destilada, em cerca de 26,2; 32,0; 32,7 e 17,9% aos 2, 4, 6 e 8 DAPT, respectivamente (Figura 8B).

Em geral, sob condições controle, o comprimento da radícula ou da parte aérea não foi alterado pelo pré-tratamento das sementes (Figura 8). A foto da Figura 9 mostra a morfologia e o crescimento das plântulas de pinhão-mansão com 40 h após o pré-tratamento com NPS e aos 2 e 3 DAPT.

4.2.3. Teores dos íons potássio, sódio e cloreto

Aos 2 DAPT, os teores de K^+ no endosperma das plântulas de pinhão-mansão apresentaram pequena redução pelo estresse salino, independentemente do pré-tratamento (Figura 10A). No entanto, a partir do 4º DAPT, a salinidade aumentou em 90% os teores de K^+ , em média em relação ao controle, o qual em parte foi revertido pelo pré-tratamento com NPS. Em condições controle, foram poucas ou inexistentes as alterações nos teores desse íon, exceto aos 8 DAPT, em que o pré-tratamento com NPS induziu um aumento de 120%, em relação

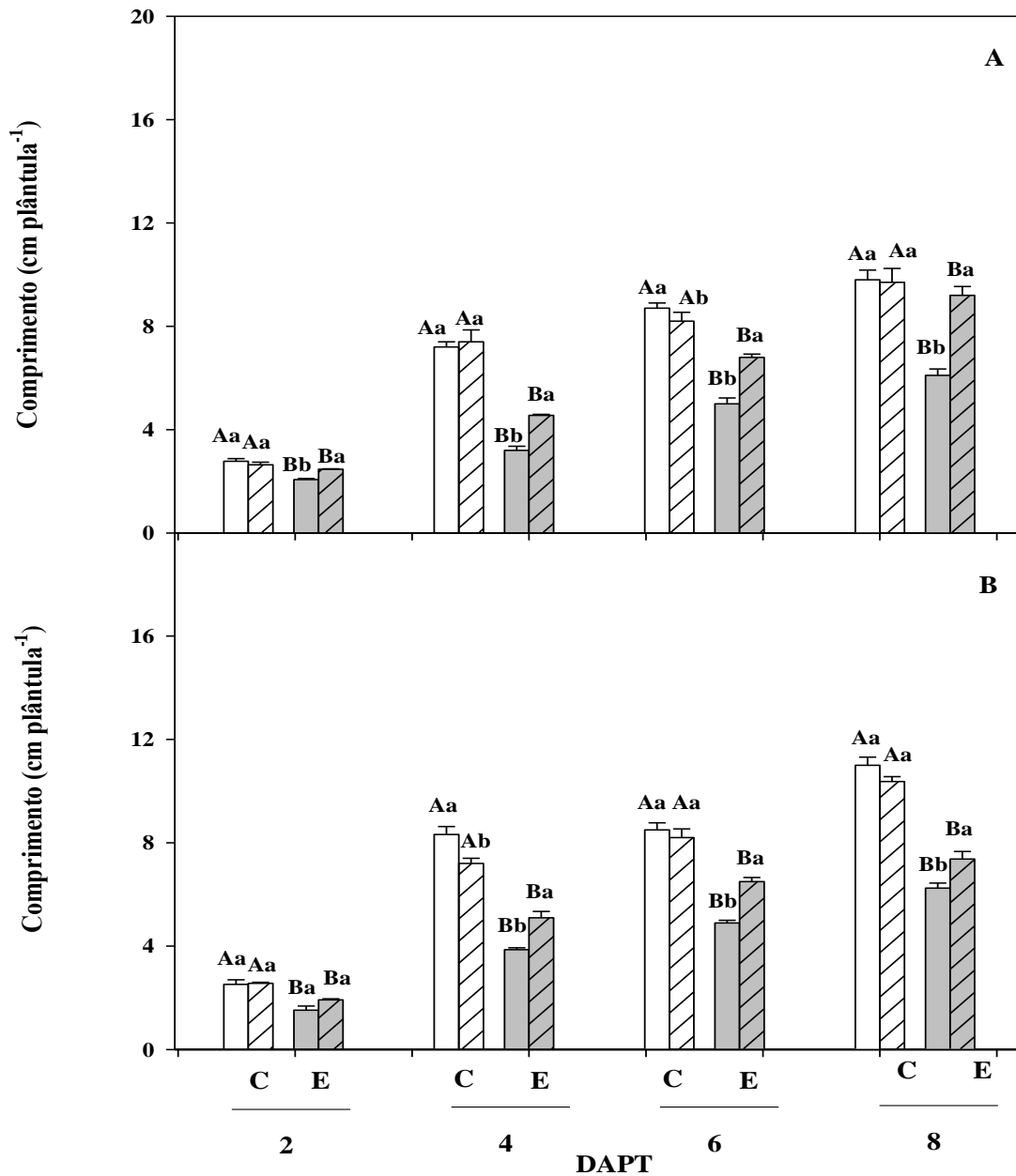


Figura 8 - Comprimento da parte aérea (A) e da radícula (B) de plântulas de pinhão-mansó aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS a 75 μ M (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

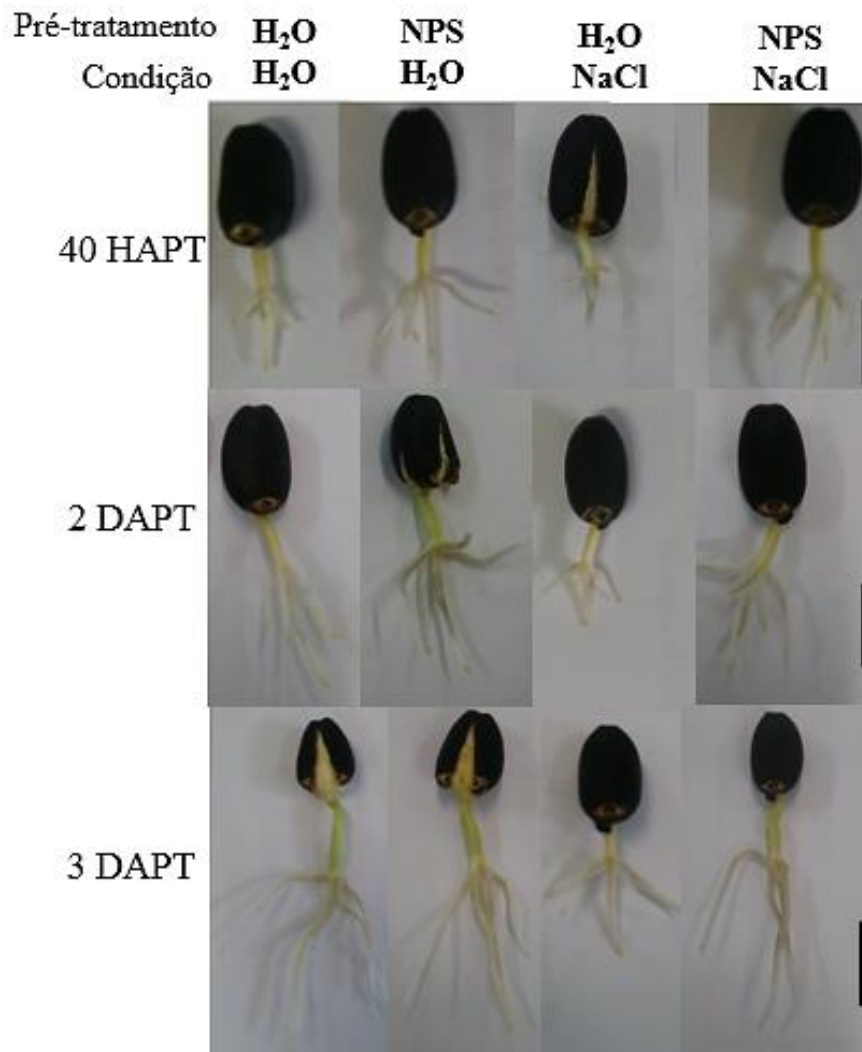
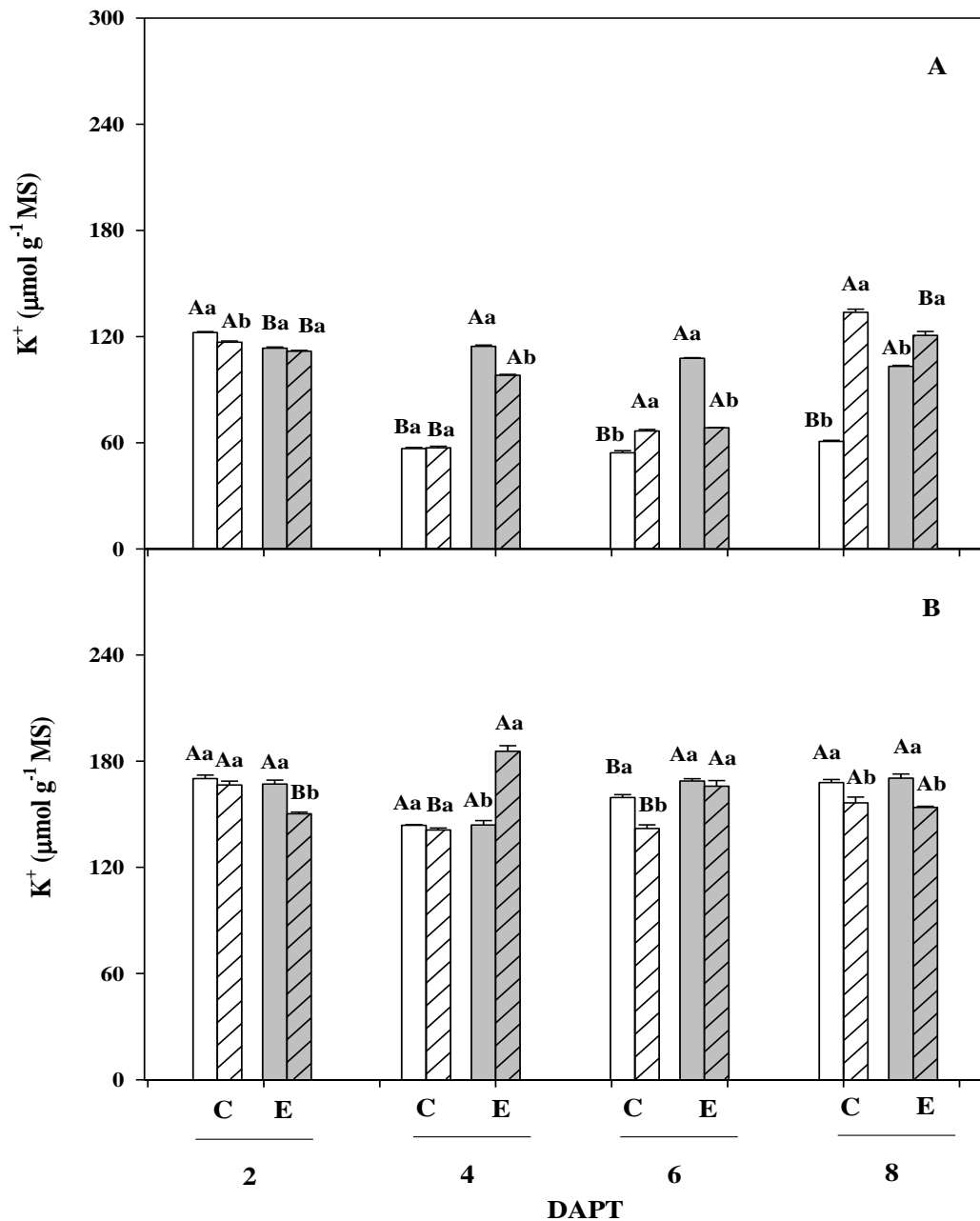


Figura 9 – Foto das plântulas de pinhão-mansô (*Jatropha curcas*) com 40 horas após o pré-tratamento (HAPT) e aos 2 e 3 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M, e semeadas em condições controle (água destilada) ou de estresse salino (NaCl a 100 mM). As barras pretas, em cada período de tempo avaliado, equivalem a 1,0 centímetro.



Figura

10 - Teores de potássio (K⁺) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

àqueles do pré-tratamento com água destilada. No eixo embrionário (Figura 10B), de modo geral, os teores de K^+ apresentaram pequenas variações em função das condições de germinação e do pré-tratamento, exceto aos 4 DAPT, em que o pré-tratamento com NPS em condições salinas induziu um aumento de 31,5% nos teores desse íon, em relação ao pré-tratamento com água destilada.

Em condições controle, os teores de Na^+ variaram muito pouco ao longo dos tempos de análises, tanto no endosperma como no eixo embrionário, diferentemente do que ocorreu em condições de estresse salino, em que eles aumentaram (Figura 11). Para o caso das plântulas oriundas de sementes não pré-tratadas com NPS, os teores desse íon no endosperma foram, em média, 76% maiores que aqueles na respectiva condição controle (Figura 11A), enquanto no eixo embrionário, esse valor foi, em média, 124% maiores (Figura 11B). Entretanto, nas plântulas provenientes de sementes pré-tratadas com NPS, esses aumentos devidos ao estresse salino foram em parte atenuados em ambos os órgãos estudados, sendo, no endosperma, os teores desse íon foram 34% maiores, enquanto que, no eixo embrionário, esse valor foi em média 98% maior que aquele da respectiva condição controle, destacando-se que no 2º DAPT com NPS, houve uma intensa redução nos teores de Na^+ nesse órgão (Figura 11B).

No endosperma, sob condições controle, os teores de Cl^- variaram pouco ao longo da germinação, exceto aos 8 DAPT, no qual as plântulas pré-tratadas com água destilada, o teor desse íon foi fortemente diminuído (Figura 12A). Nesse mesmo órgão, aos 4 e 6 DAPT, a salinidade aumentou os teores de Cl^- , em relação ao controle, porém esse aumento foi menor nas plântulas oriundas de sementes pré-tratadas com NPS. No eixo embrionário, logo a partir do 2º DAPT, os teores de Cl^- das plântulas oriundas de sementes pré-tratadas com água destilada foram aumentados pela salinidade, especialmente aos 6 e 8 DAPT (Figura 12B). Nesse mesmo órgão, o pré-tratamento das sementes com NPS, da mesma forma que aconteceu no endosperma, atenuou em parte este aumento nos teores de cloreto, exceto aos 8 DAPT, cujos valores não dependeram do tipo de pré-tratamento.

4.2.4. Peroxidação de lipídios e conteúdo de H_2O_2

Os teores de TBARS, indicador da peroxidação lipídica, foram alterados pelo pré-tratamento e condições de germinação, tanto no endosperma, quanto no eixo embrionário (Figura 13). No endosperma, os valores dessa variável oscilaram ao longo do tempo analisado, sendo que, nas plântulas de sementes pré-tratadas com água destilada, aos 2 e 6 DAPT, a salinidade não alterou os teores de TBARS, em relação ao controle, enquanto que aos 4 e 8

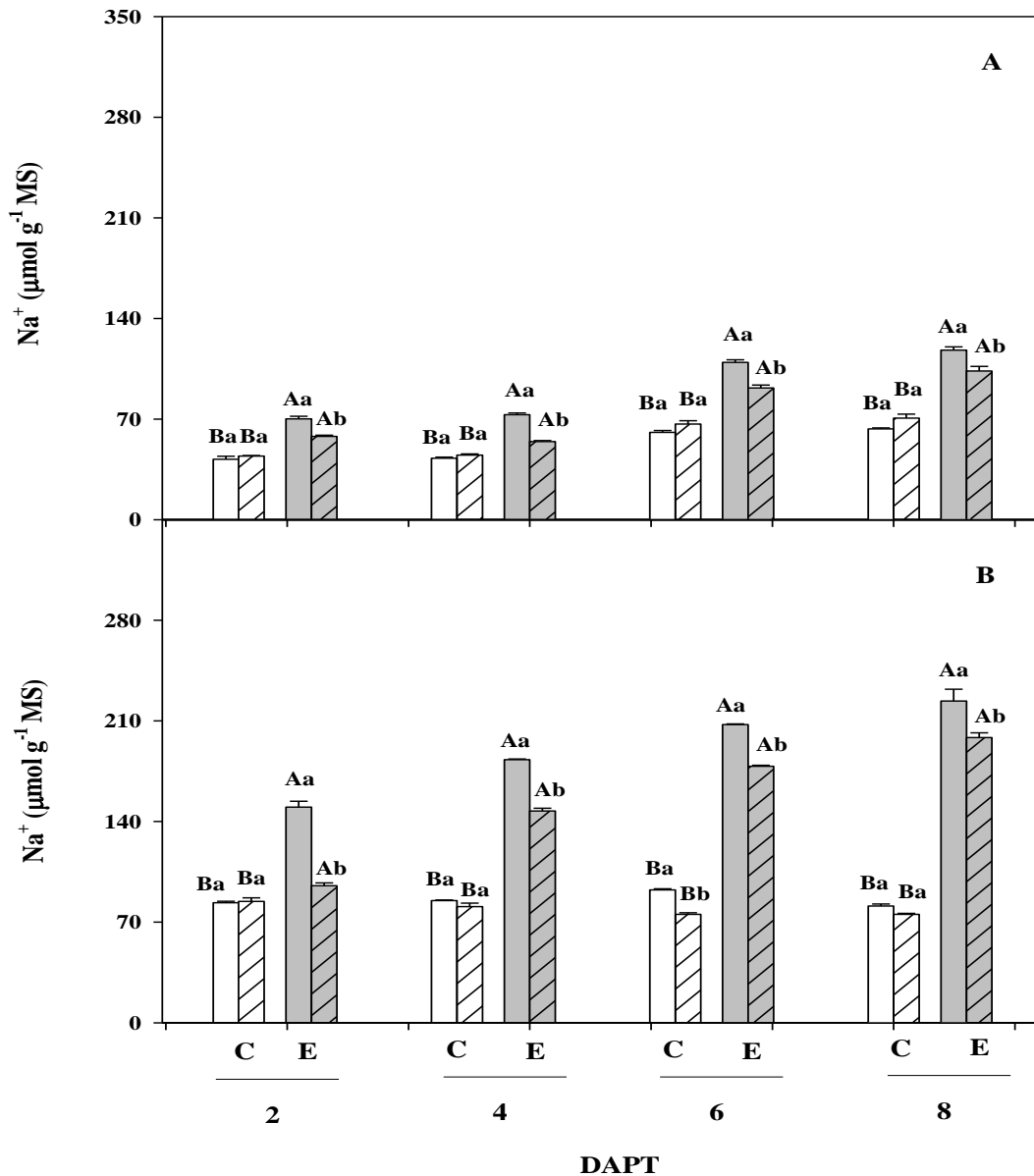


Figura 11 - Teores de sódio (Na) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

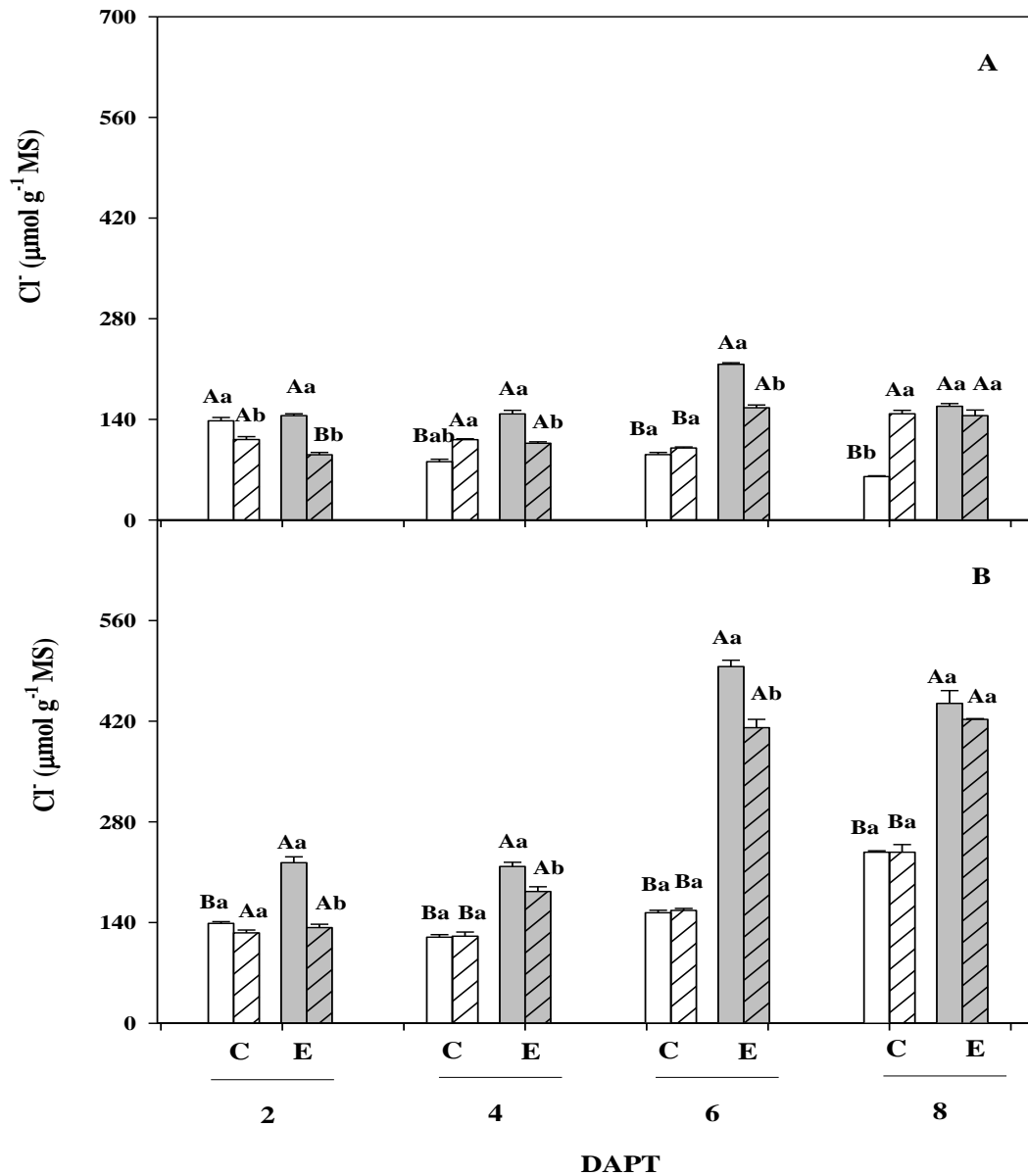


Figura 12 - Teores de cloreto (Cl^-) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a $75 \mu\text{M}$ (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

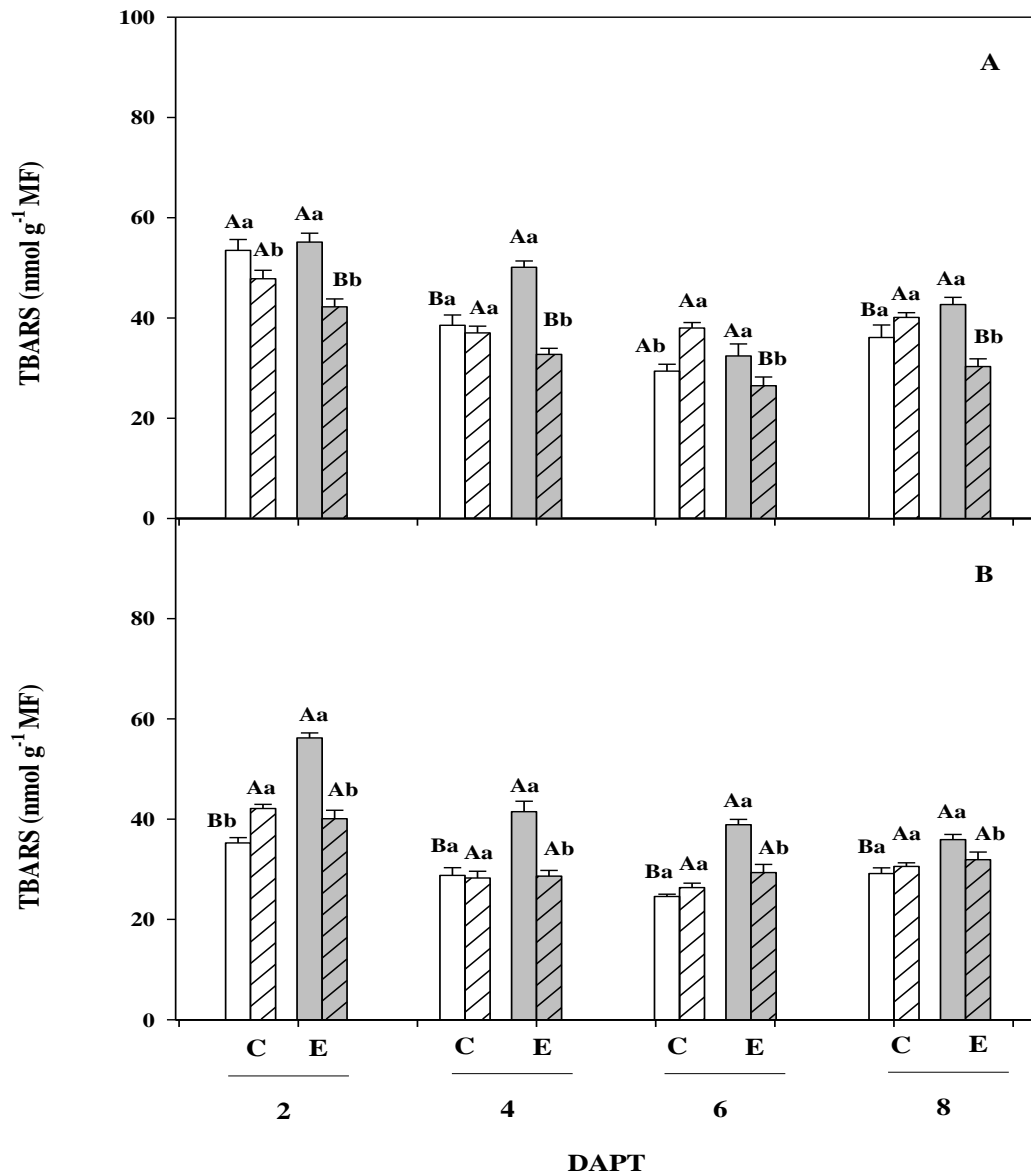


Figura 13 - Teores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-manso aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS a 75 μ M (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

DAPT, houve um aumento; sob condições de salinidade, em quaisquer dos tempos analisados, o pré-tratamento das sementes com NPS propiciou reduções significativas nos teores de TBARS, em relação aos respectivos controles (Figura 13A). Ainda no endosperma, os valores de TBARS das plântulas oriundas do pré-tratamento com NPS foram inferiores em 23,5, 34,7, 18,4 e 29% aos 2, 4, 6 e 8 DAPT, respectivamente, àqueles do pré-tratamento com água destilada, nessa mesma condição de estresse e nos respectivos tempos de análises (Figura 13A).

No eixo embrionário, em todos os tempos analisados, o estresse salino aumentou os teores de TBARS nas plântulas oriundas de sementes pré-tratadas com água destilada, em relação ao controle (Figura 13B). Entretanto, nesse mesmo órgão e na mesma condição de estresse, o pré-tratamento com NPS reverteu esse aumento, de tal forma que os teores de TBARS dessas plântulas foram inferiores em 28,6, 31,0, 25,5 e 11,1%, respectivamente aos 2, 4, 6 e 8 DAPT, àqueles de plântulas pré-tratadas com água destilada e submetidas à salinidade (Figura 13B).

No endosperma das plântulas oriundas do pré-tratamento das sementes com água destilada, o estresse salino ocasionou forte aumento nos teores de H_2O_2 , em relação à condição controle, sendo aos 2, 4, 6 e 8 DAPT observados aumentos, respectivamente de 39,8; 42,92; 61,47 e 199,2% (Figura 14A). Esse aumento nos teores de H_2O_2 pela salinidade foi drasticamente reduzido com o pré-tratamento das sementes com NPS, aos 2 DAPT, e completamente revertido aos 4 DAPT, quando o teor dessa ROS no tratamento salino se igualou àquele do controle, no pré-tratamento com água destilada. Aos 6 e 8 DAPT, o pré-tratamento com NPS reduziu os teores de H_2O_2 em 19,6 e 10,2%, respectivamente, em condições de estresse.

No eixo embrionário, os teores de H_2O_2 foram inferiores àqueles do endosperma, exceto ao 2 DAPT. No entanto, a situação foi semelhante àquela no endosperma, tendo o pré-tratamento com NPS reduzido parcialmente o aumento causado pela salinidade nos teores dessa ROS, com reduções de 24,3, 34,3, 21,1 e 31,9% aos 2, 4, 6 e 8 DAPT, respectivamente (Figura 14B).

Em condições controle, os teores de H_2O_2 em ambos os tecidos estudados não foram influenciados pelo pré-tratamento, embora tenham sido modificados ao longo da germinação (Figura 14). No endosperma, nessa condição de germinação, os menores teores dessa ROS foram aos 8 DAPT, enquanto no eixo embrionário, os teores diminuíram drasticamente a partir do 4º DAPT.

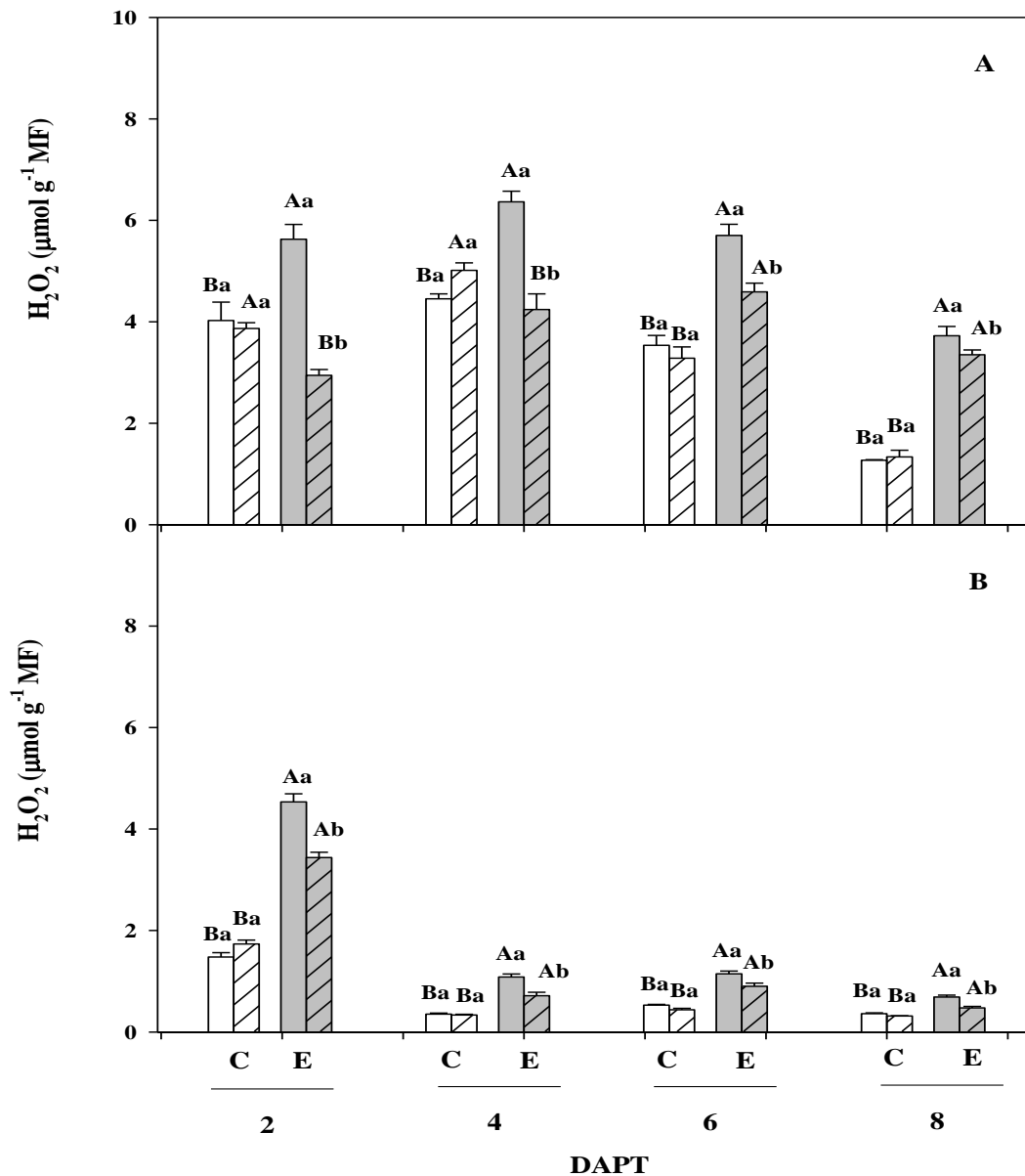


Figura 14 - Teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

4.2.5. Atividade das enzimas antioxidativas

No endosperma, a atividade da SOD se mostrou crescente ao longo da germinação, e aumentou em função do pré-tratamento com NPS nas plântulas do controle e naquelas do estresse salino, com exceção nesse caso daquelas aos 4 DAPT (Figura 15A). Em adição, a salinidade causou uma significativa redução na atividade dessa enzima a partir do 4º DAPT.

No eixo embrionário, em geral, a atividade da SOD foi aumentada em função do pré-tratamento das sementes com NPS, tanto em condições controle, quanto de estresse salino (Figura 15B). Uma exceção a tal fato ocorreu aos 4 DAPT, em que, nas condições controle, a atividade dessa enzima manteve-se inalterada pelo pré-tratamento, e em condições de salinidade, o pré-tratamento com NPS propiciou uma pequena redução na atividade. Ainda no eixo embrionário, foi observado que a atividade da SOD, nas plântulas oriundas do pré-tratamento com água destilada, somente foi afetada pela salinidade aos 8 DAPT, com um aumento de 60%, em relação à condição controle (Figura 15B).

A atividade da CAT no endosperma, em geral, não foi afetada pelo estresse salino nas plântulas não pré-tratadas com NPS; contudo, aos 4 DAPT, essa atividade foi incrementada pela salinidade, atingindo um valor 123% maior que aquele da condição controle (Figura 16A). Aos 6 DAPT, o pré-tratamento com NPS induziu um aumento na atividade da CAT, tanto em condições controle, quanto em condições de estresse. Já aos 2 e 8 DAPT, o pré-tratamento com NPS aumentou a atividade da CAT no endosperma de plântulas crescendo em condições salinas (Figura 16A).

No eixo embrionário, a atividade da CAT, aos 2 e 4 DAPT, foi aumentada em condições de estresse salino apenas nas plântulas oriundas do pré-tratamento com NPS, não tendo havido quaisquer outras alterações nas outras condições (Figura 16B). Em condições controle, a atividade da CAT, aos 6 e 8 DAPT, foi aumentada em função do pré-tratamento com NPS. Nesse mesmo período de germinação, a atividade dessa enzima foi aumentada em decorrência apenas da salinidade, porém o contrário ocorreu quando nessa mesma condição as plântulas eram provenientes de sementes pré-tratadas com NPS (Figura 16B).

No endosperma, a atividade da APX aumentou ao longo da germinação, mas foi reduzida em função da salinidade em todos os tempos analisados (Figura 17A). De modo geral, o pré-tratamento com NPS aumentou a atividade dessa enzima, tanto em condições controle, como de estresse salino (nesse caso, exceto no 4º DAPT, no qual as atividades não diferiram).

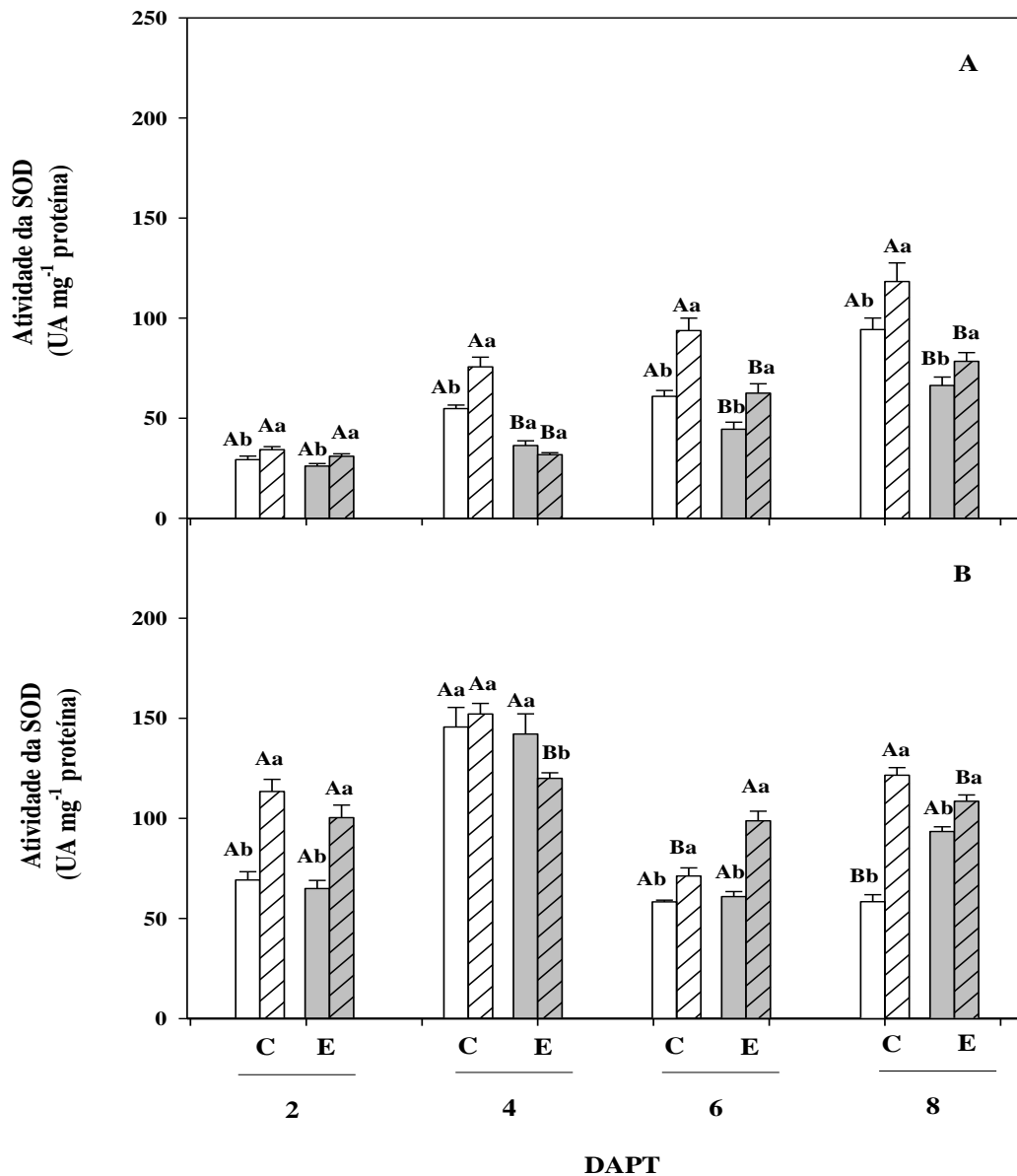


Figura 15 - Atividade da dismutase do superóxido (SOD) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansinho aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

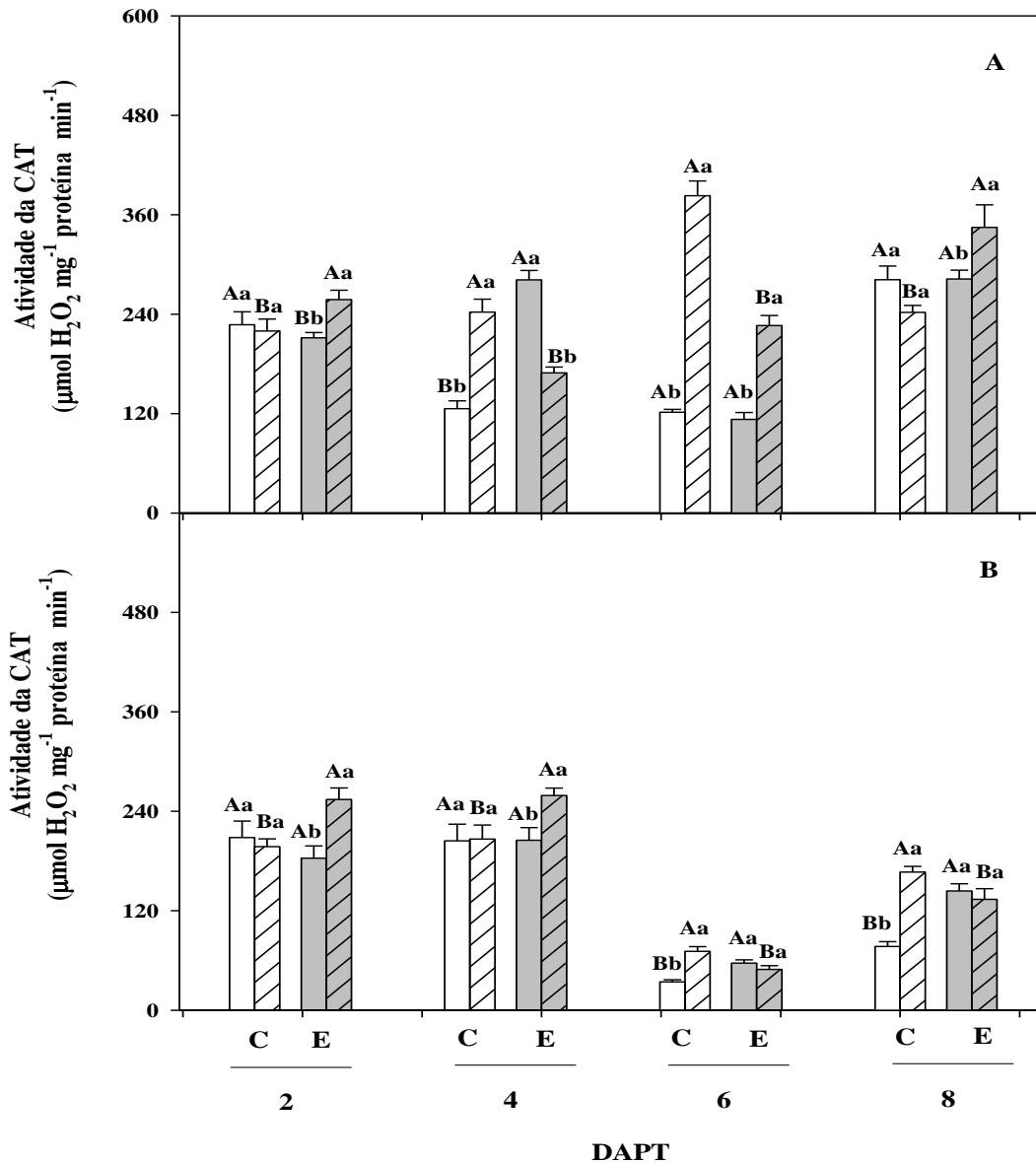


Figura 16 - Atividade da catalase (CAT) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansó aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

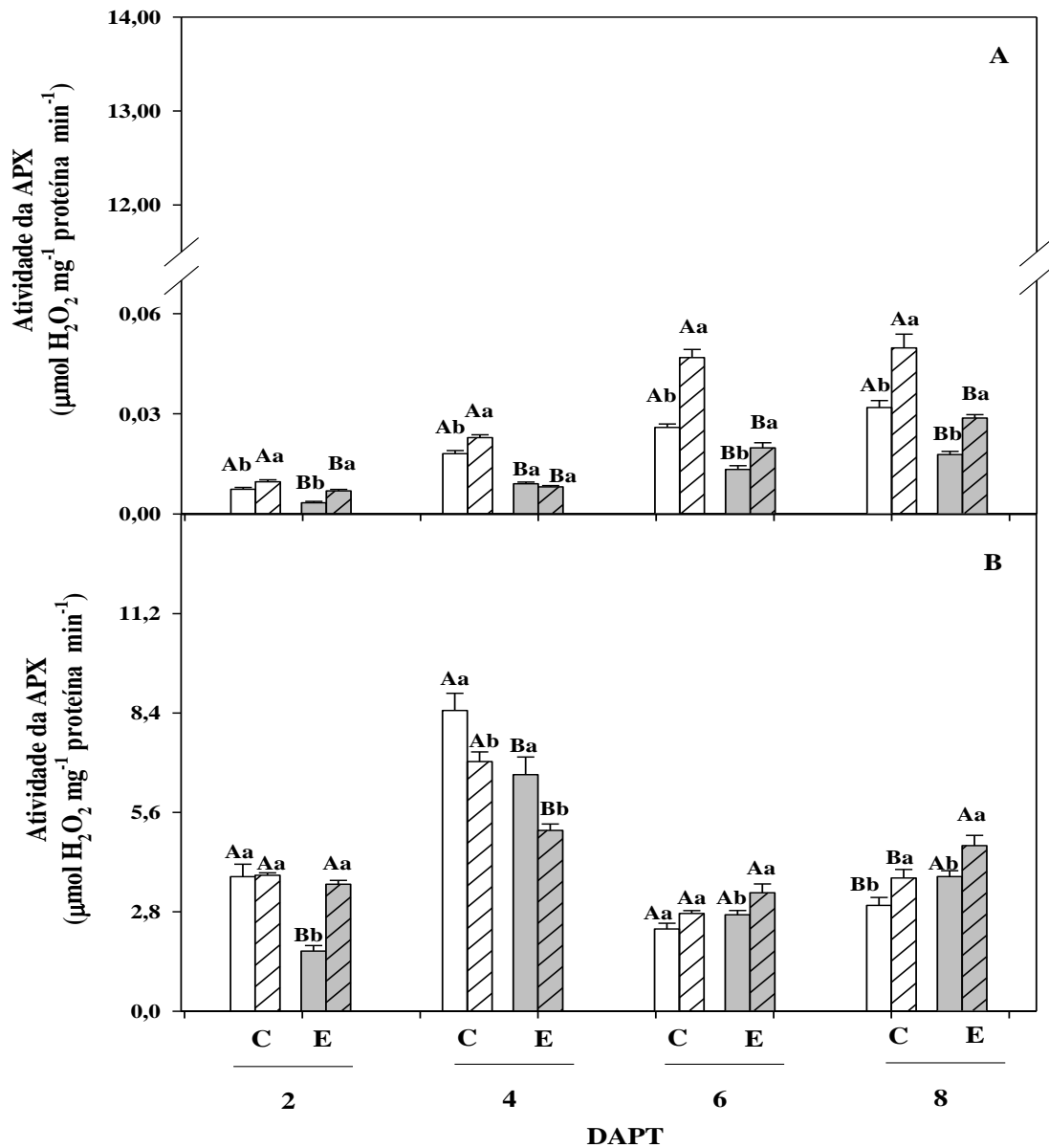


Figura 17 - Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

A atividade da APX, no eixo embrionário, foi reduzida pela salinidade em 55,3%, aos 2 DAPT, porém o pré-tratamento com NPS induziu a atividade dessa enzima, mantendo a níveis semelhantes àqueles das condições controle (Figura 17B). Aos 4 DAPT, a atividade dessa enzima foi reduzida tanto pela salinidade, quanto pelo pré-tratamento. Aos 6 DAPT, apenas o pré-tratamento com NPS, em condições salinas, causou efeito sobre a atividade da APX, aumentando-a. Por fim, aos 8 DAPT, no eixo embrionário, a atividade da enzima foi aumentada tanto pela salinidade, quanto pelo pré-tratamento das sementes com NPS. É importante destacar que a atividade da APX foi substancialmente maior no eixo embrionário do que no endosperma, com valores, em média, 300 vezes maiores.

A atividade da GPX, no endosperma, que apresentou valores de atividade muito baixos que aqueles do eixo embrionário (cerca de 50 vezes menores), não foi detectada nos estádios iniciais de germinação, aos 2 e 4 DAPT (Figura 18). Em condições controle, a atividade dessa enzima, aos 6 e 8 DAPT, foi reduzida pelo pré-tratamento com NPS, bem como pela salinidade. Porém, em condições salinas, o pré-tratamento com NPS aos 8 DAPT, foi capaz de reverter esse quadro, elevando a atividade da GPX a valores similares ao das plântulas do controle oriundas de sementes pré-tratadas com NPS (Figura 18A).

No eixo embrionário, aos 2 DAPT, a atividade da GPX foi muito menor que aquela observada nos outros tempos estudados (Figura 18B). Nesse mesmo dia, a atividade dessa enzima foi aumentada pela salinidade em cerca de 20%, em relação ao controle, e o pré-tratamento com NPS ocasionou reduções na atividade dessa enzima, tanto em condições controle, quanto de salinidade. No 4º DAPT, apenas em condições salinas, o NPS causou uma redução na atividade da GPX. Aos 6 e 8 DAPT, a atividade da GPX não foi alterada pelo pré-tratamento com NPS, porém aumentou em função da salinidade (Figura 18B).

No endosperma, a atividade da GR aumentou durante a germinação, tanto em condições controle como de salinidade (Figura 19A). Em geral, em condições controle, o pré-tratamento com NPS aumentou a atividade dessa enzima. Já em condições salinas, a atividade da GR no endosperma foi maior nas plântulas do pré-tratamento com NPS, em todos os tempos analisados. Comparando-se a atividade dessa enzima nas plântulas oriundas do pré-tratamento com NPS, sob condições salinas, com aquela do controle pré-tratadas com água destilada, aos 6 e 8 DAPT, elas foram substancialmente maiores, 138 e 163%, respectivamente (Figura 19A).

No eixo embrionário, sob condições controle, a atividade da GR não foi afetada significativamente pelo pré-tratamento (Figura 19B). Contudo, a atividade dessa enzima foi aumentada pela salinidade, sendo esse aumento intensificado pelo pré-tratamento com NPS, em

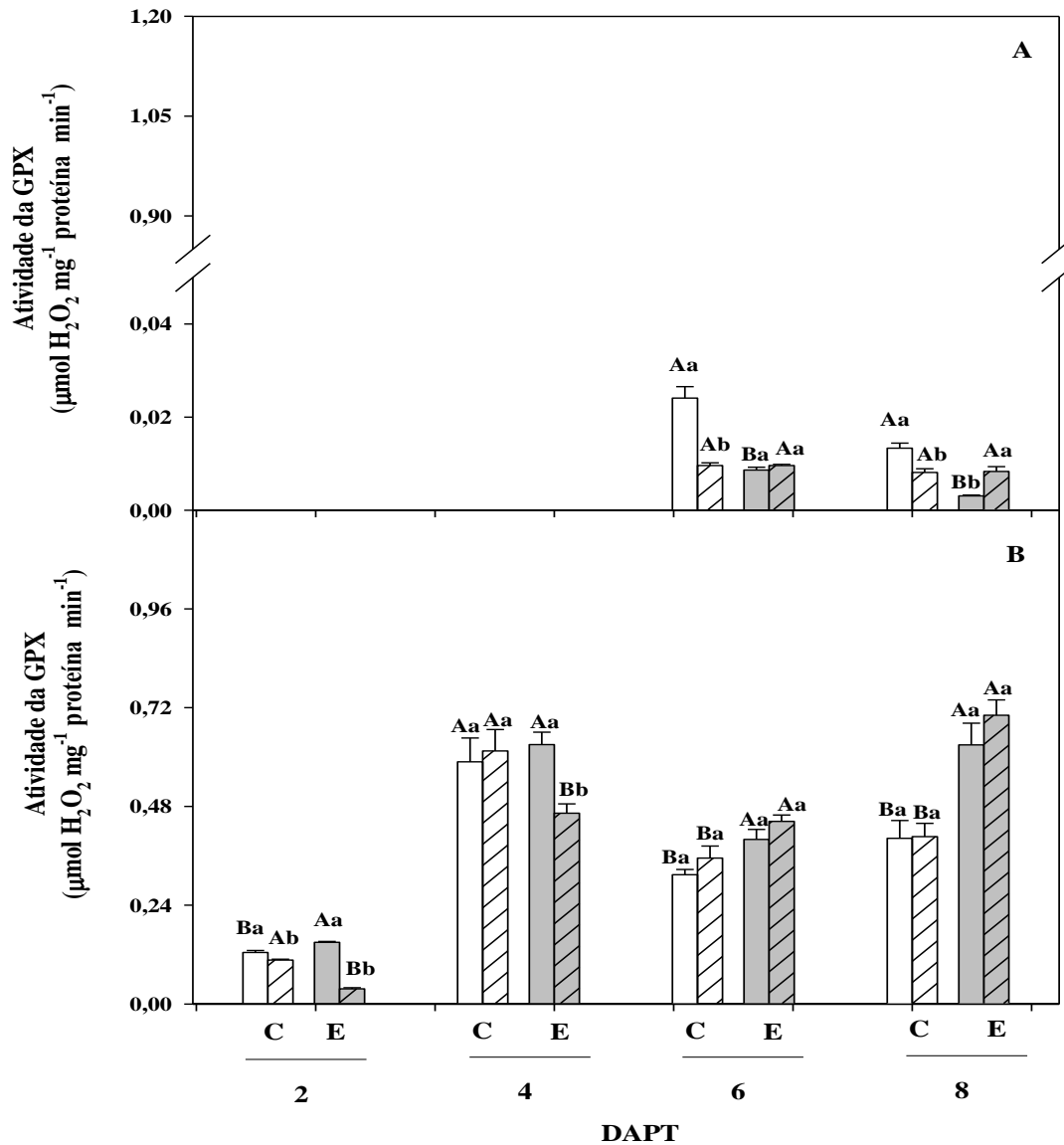


Figura 18 - Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

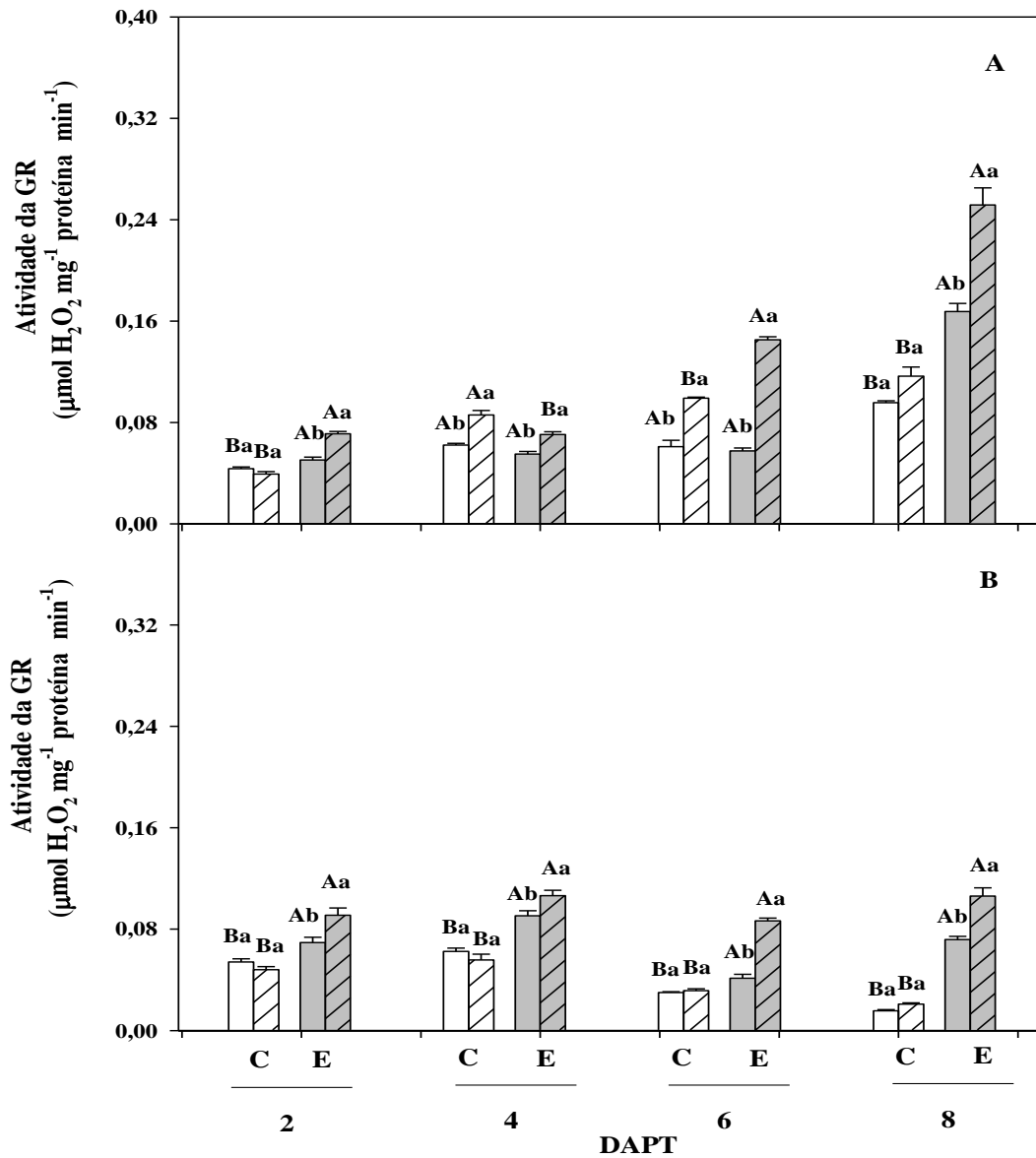


Figura 19 - Atividade da redutase da glutaciona (GR) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

todos os tempos analisados. Comparando-se os valores da atividade da GR nas plântulas oriundas do pré-tratamento com NPS, sob condições salinas, com aquela do controle pré-tratadas com água destilada, aos 6 e 8 DAPT, ela foi substancialmente maior, 190 e 580%, respectivamente (Figura 19B).

4.2.6. Antioxidantes não enzimáticos: glutatona e ascorbato

Os teores de GSH, no endosperma, decresceram ao longo da germinação e foram aumentados pela salinidade, em relação ao controle, sendo esses aumentos, em geral, intensificados pelo pré-tratamento com NPS (Figura 20A). Em condições controle, o NPS causou uma redução nos teores de GSH apenas aos 4 DAPT, sendo que nos demais, eles não diferiram significativamente.

No eixo embrionário, em geral, os teores de GSH variaram pouco durante a germinação, sendo, no entanto, observado substancial aumento em condições controle aos 8 DAPT (Figura 20B). Sob condições de estresse, os teores desse composto apresentaram comportamento variável em função do tempo de germinação. Enquanto que no 2º DAPT, seus teores foram aumentados pela salinidade, no 8º DAPT, eles foram reduzidos; nos demais dias analisados as variações foram muito pequenas. De modo geral, os teores de GSH no eixo embrionário de plântulas do tratamento controle foram pouco afetados pelo pré-tratamento das sementes com NPS, o mesmo acontecendo em condições salinas, quando os teores desse antioxidante foram apenas levemente aumentados por esse pré-tratamento nos dois dias iniciais de germinação avaliados (Figura 20B).

Os teores de GSSG no endosperma de plântulas cujas sementes não foram pré-tratadas com NPS aumentaram em função do estresse salino, em relação à condição controle, em todos os tempos analisados (Figura 21A). Exceto no último dia de germinação estudado, em que os teores desse antioxidante foram drasticamente menores que os dos demais, o pré-tratamento com NPS reverteu em parte esse aumento nos teores de GSSG, especialmente aos 2 DAPT, cujo aumento pela salinidade foi reduzido pelo pré-tratamento com NPS em cerca de 50%. No endosperma, sob condições controle, o pré-tratamento com NPS também ocasionou pequenas diminuições nos teores de GSSG, porém essa resposta não foi observada no 4º DAPT, no qual houve um pequeno incremento.

No eixo embrionário, os teores de GSSG aumentaram com o estresse salino, exceto no 8º DAPT, com destaque para o grande aumento, em relação ao controle, observado aos 2 DAPT, de cerca de 250% (Figura 21A). O pré-tratamento com NPS, no entanto, teve pouca ou nenhuma

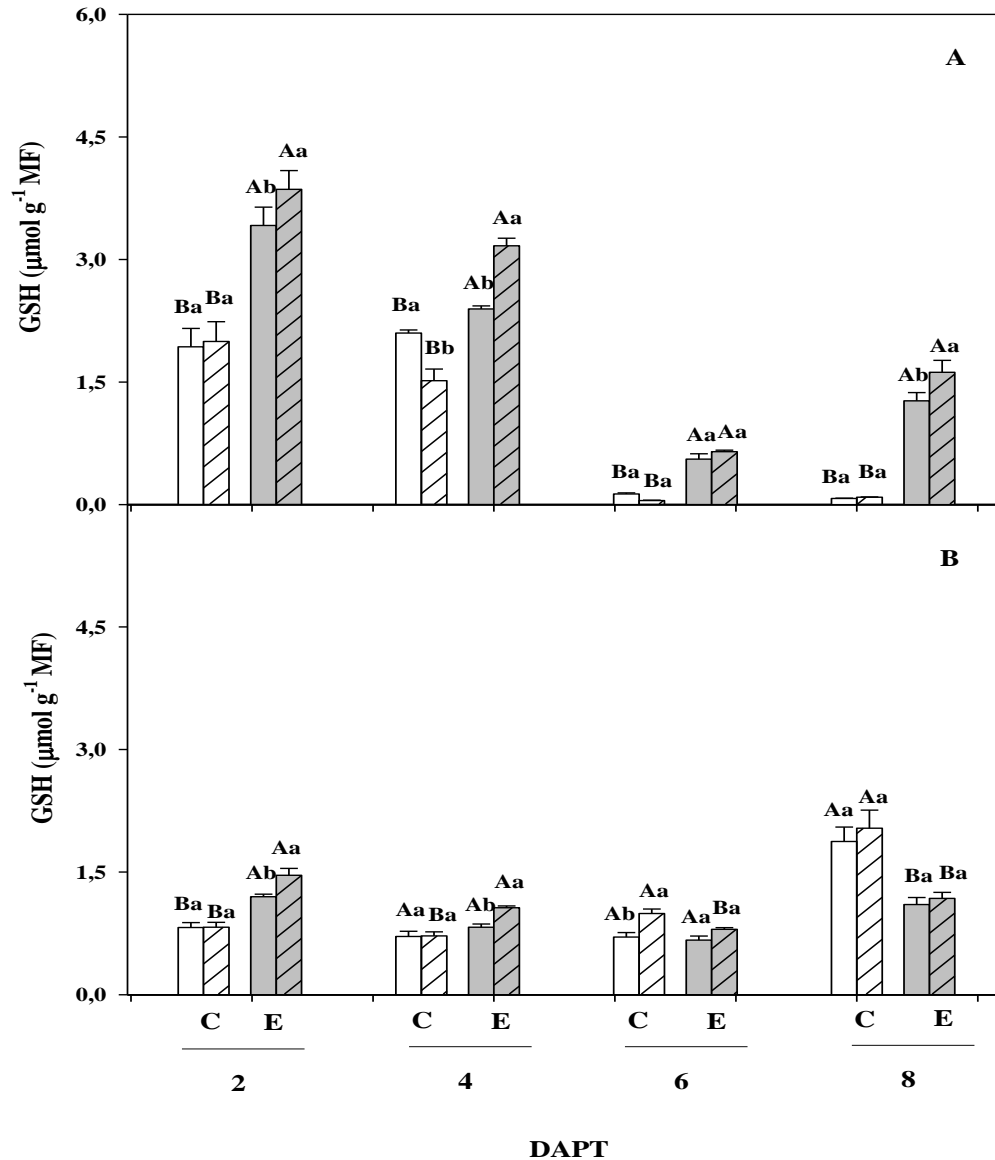


Figura 20 - Teores de glutationa reduzida (GSH) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansó aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 µM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

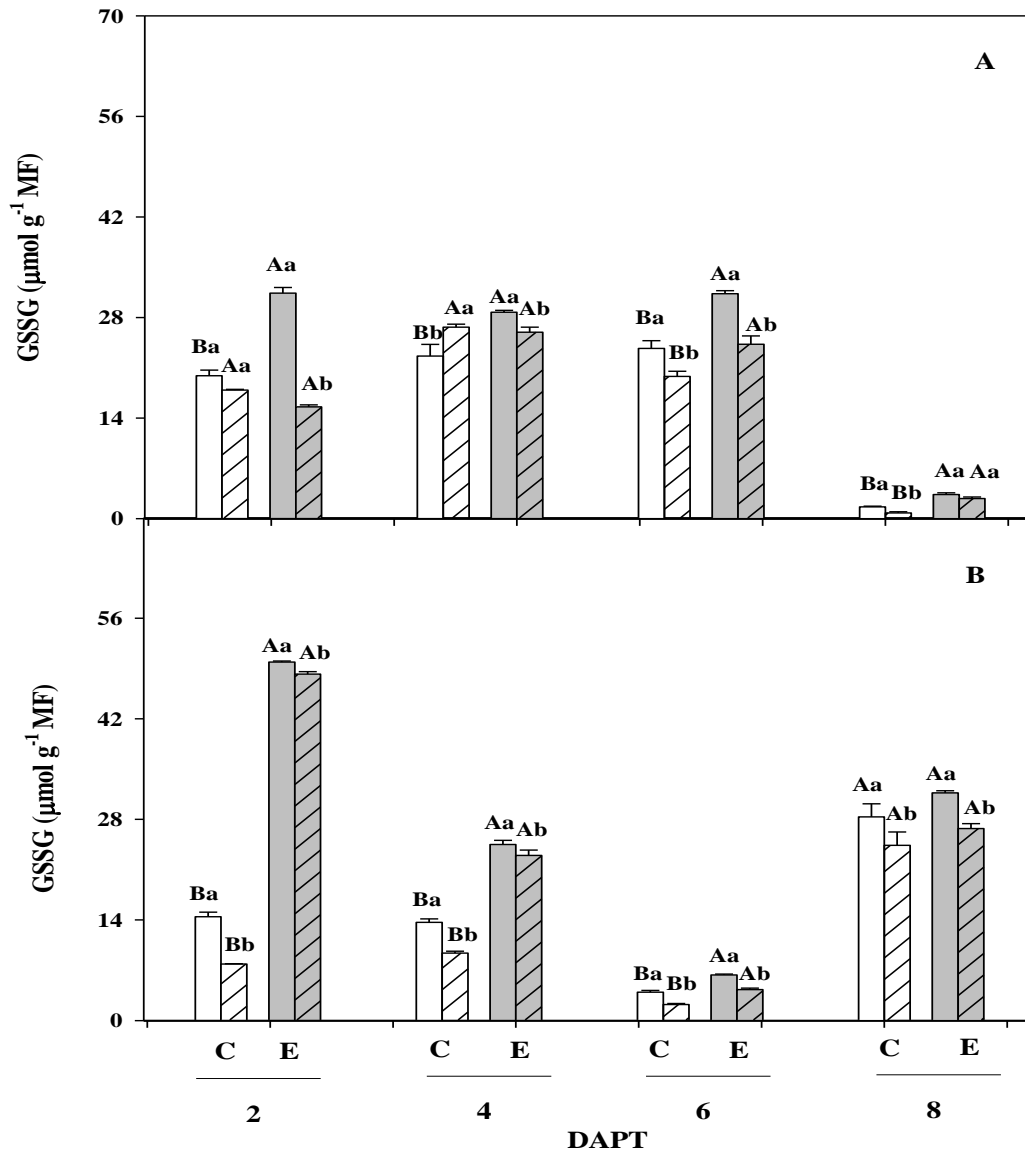


Figura 21 - Teores de glutatona oxidada (GSSG) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

influência nos aumentos causados pela salinidade (caso acontecido aos 2 e 4 DAPT), embora em condições controle esse pré-tratamento tenha causado uma redução nos teores de GSSG em todos os tempos de análise.

O estado redox da glutaciona, representado pela razão $GSH/(GSH + GSSG)$, expressa em porcentagem, no endosperma das plântulas oriundas de sementes não pré-tratadas com NPS, foi reduzido pela salinidade, em relação ao controle, aos 2 e 4 DAPT; porém, ele foi expressivamente aumentado por esse estresse aos 6 e 8 DAPT, com aumentos de 240 e 540%, respectivamente, em relação controle (Figura 22A). Em todos os períodos de tempos estudados, em condições de estresse salino, o pré-tratamento com NPS causou aumento significativo no estado redox da glutaciona, sendo o maior aumento observado aos 2 DAPT (cerca de 100%). Já, sob condições controle, o pré-tratamento com NPS reduziu o estado redox da glutaciona aos 4 e 6 DAPT, porém aumentou nos demais tempos de germinação analisados, especialmente aos 8 DAPT (Figura 22A).

No eixo embrionário, o estado redox foi reduzido pelo estresse salino, tanto nas plântulas oriundas de sementes pré-tratadas com NPS, como naquelas do pré-tratamento com água destilada, em relação aos respectivos controles (Figura 22B). No entanto, o pré-tratamento com NPS reverteu em parte essa redução aos 4 e 6 DAPT, fazendo com que o estado redox da glutaciona retornasse a níveis semelhantes ao do controle sem pré-tratamento com NPS. Por outro lado, em condições controle, o pré-tratamento com NPS aumentou o estado redox da glutaciona em todos os tempos analisados, o qual, por sua vez, apresentou no 6º DAPT os maiores valores nessas condições (em média, cerca de 130% superiores aos valores dos demais).

Os teores de AsA endospérmicos, tanto em condições controle como de estresse salino, independentemente do pré-tratamento, decresceram ao longo da germinação, atingindo aos 8 DAPT, valores em média, iguais a cerca de 25% daqueles aos 2 DAPT (Figura 23A). Exceto nesse dia, o estresse salino aumentou os teores de AsA no endosperma das plântulas não pré-tratadas com NPS, em relação ao respectivo controle. Além disso, em condições salinas, o pré-tratamento com NPS intensificou esse aumento nos teores de AsA, exceto no 4º DAPT, cujos valores nessas condições não diferiram entre si. Contudo, nesse mesmo dia, comparando o teor de AsA no tratamento salino do pré-tratamento com NPS, este foi superior em cerca de 50%, àquele do respectivo controle (Figura 23A). Nas condições controle, o NPS não teve efeito algum sobre os teores de AsA.

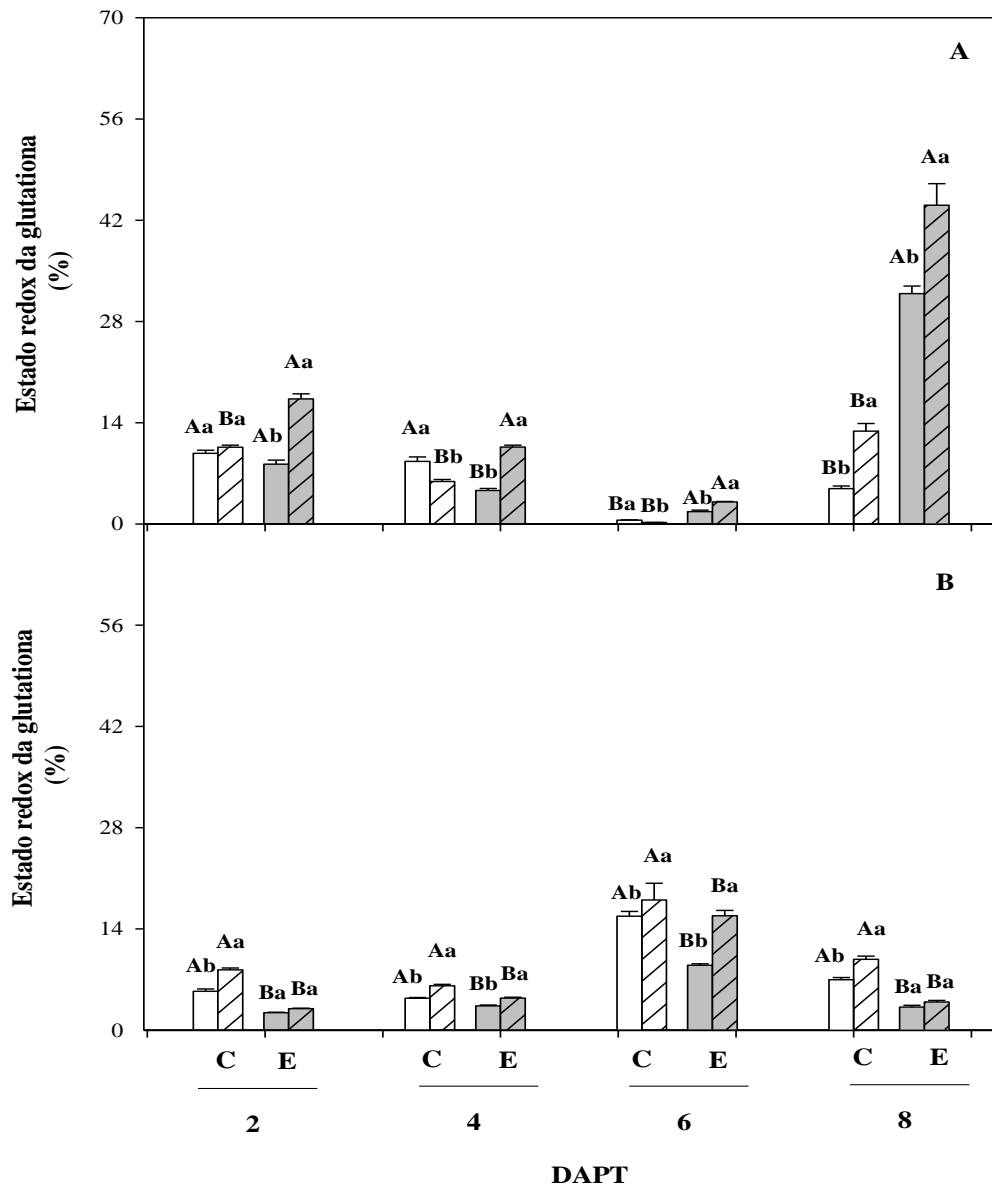


Figura 22 - Estado redox da glutatona [GSH/ (GSH + GSSG)] no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansó aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

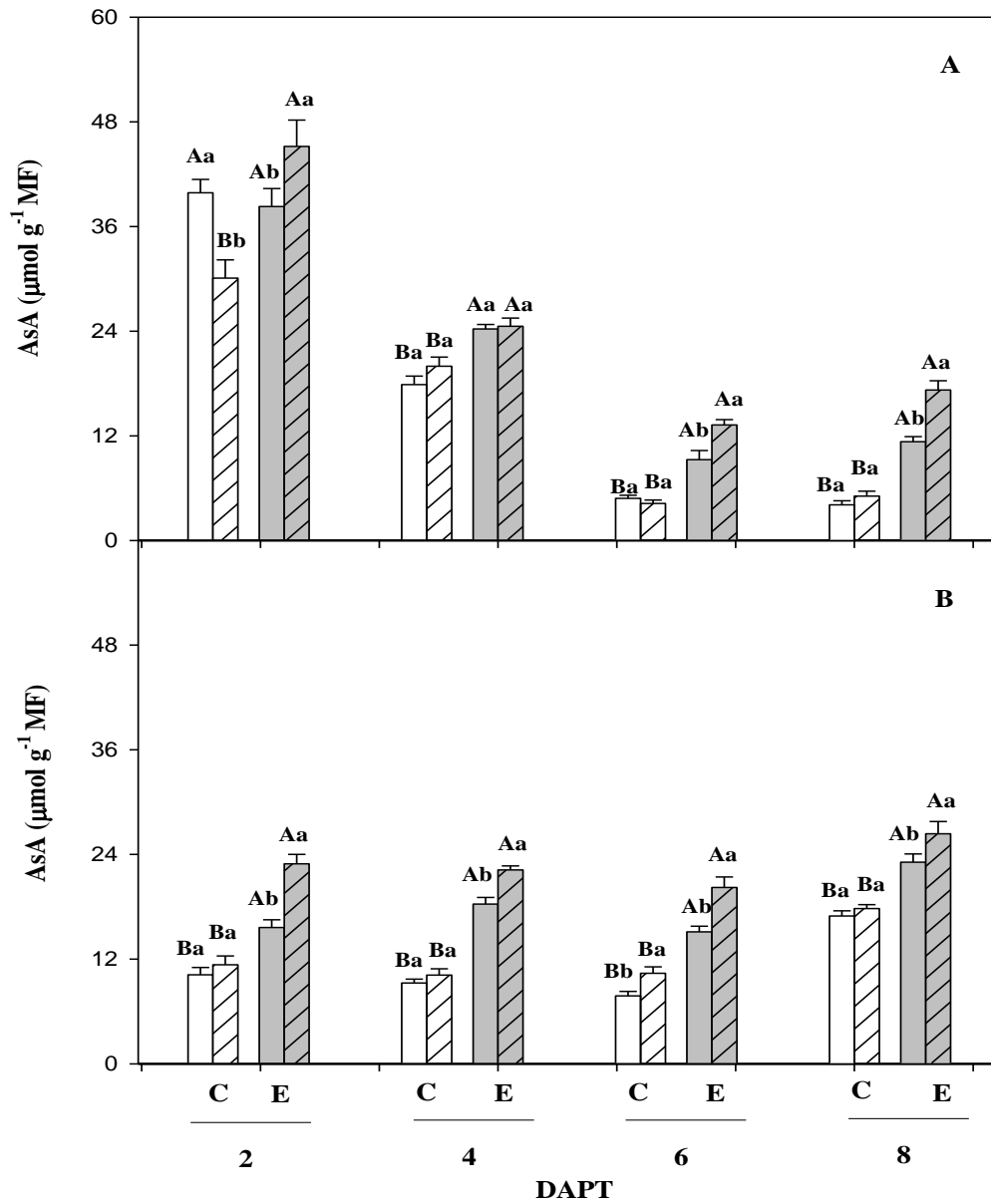


Figura 23 - Teores de ascorbato reduzido (AsA) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 µM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

No eixo embrionário, os teores de AsA apresentaram comportamentos semelhantes frente aos tratamentos, em todos os períodos de tempo analisados (Figura 23B). O estresse salino aumentou os teores desse antioxidante no estado reduzido, em relação ao controle, em média, de 70%, enquanto que no pré-tratamento com NPS este aumento foi, em média, de 90%. Ao longo da germinação, os teores de AsA em condições controle não dependeram do pré-tratamento empregado, se com água destilada ou com NPS (Figura 23B).

Os teores de DHA, no endosperma, foram, de modo geral, pouco afetados pelas condições de crescimento das plântulas ou pelo pré-tratamento com NPS (Figura 24A). Uma exceção a isso, ocorreu aos 2 DAPT, em que os teores de DHA não foram alterados pela salinidade, porém o pré-tratamento com NPS causou uma redução significativa nesses teores, o mesmo acontecendo com o controle, que também decresceu em função do pré-tratamento com NPS. Do 2º para o 4º DAPT, os teores endospermicos de DHA foram fortemente reduzidos, independentemente do tratamento (em média, cerca de 80%). No 4º DAPT, observou-se um pequeno aumento no teor de DHA pela salinidade, o qual não foi alterado pelo pré-tratamento com NPS (Figura 24A).

Os teores de DHA, no eixo embrionário, apresentaram pequena tendência de queda ao longo do desenvolvimento inicial das plântulas de pinhão-manso, e foram quantitativamente pouco alterados pela salinidade, a partir do 4º DAPT (Figura 24B). Sob condições de salinidade, o pré-tratamento com NPS não acarretou alteração significativa nos teores de DHA; porém, sob condições controle, com exceção do 8º DAPT, o pré-tratamento com NPS causou pequenos, mas estatisticamente significativos, aumentos nos teores desse antioxidante na forma oxidada.

No endosperma, o estado redox do ascorbato, expresso pela razão $AsA/(AsA + DHA)$, em percentagem, foi aumentado pela salinidade, em relação à condição controle, somente aos 6 e 8 DAPT (Figura 25A). Apesar disso, esta variável em condições de estresse foi aumentada pelo pré-tratamento com NPS, em média, em cerca de 26%, levando em conta todos os dias analisados. O estado redox do ascorbato foi fortemente reduzido do 4º para o 6º DAPT, em todos os tratamentos e condições de germinação, sendo na condição controle observada uma redução média de 76,7% e em condições salinas uma redução de 56,1% (Figura 25A).

No eixo embrionário, o estado redox do ascorbato apresentou valores praticamente iguais aos 2, 4 e 6 DAPT e, em cada um desses tempos de germinação, ele foi aumentado pelo estresse salino, sendo este aumento intensificado pelo tratamento com NPS, inclusive nas plântulas aos 8 DAPT sob condições salinas (Figura 25B). Sob condições controle, o estado redox do ascorbato foi pouco afetado pelo pré-tratamento com NPS, embora no último período

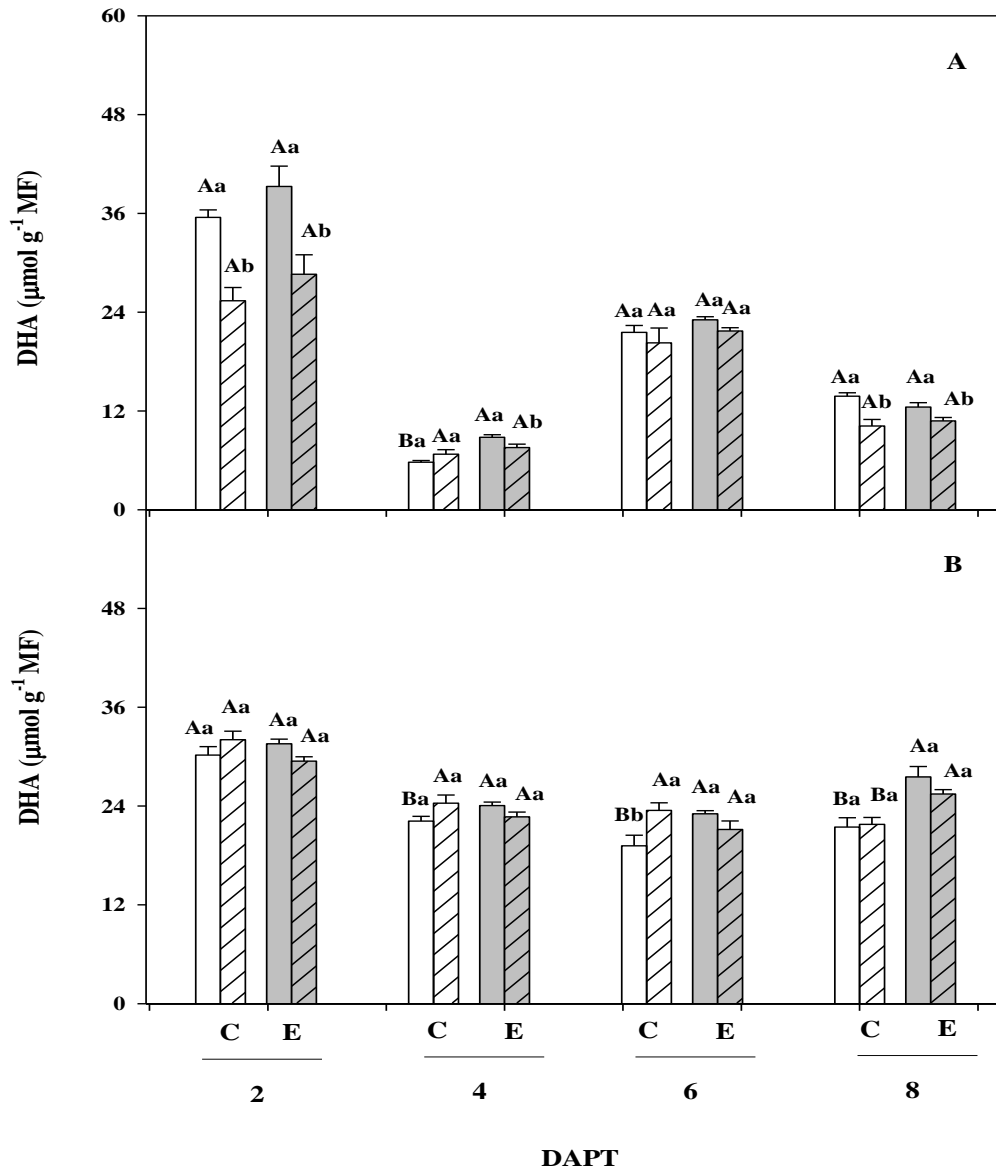


Figura 24 - Teores de ascorbato oxidado (DHA) no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 µM (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

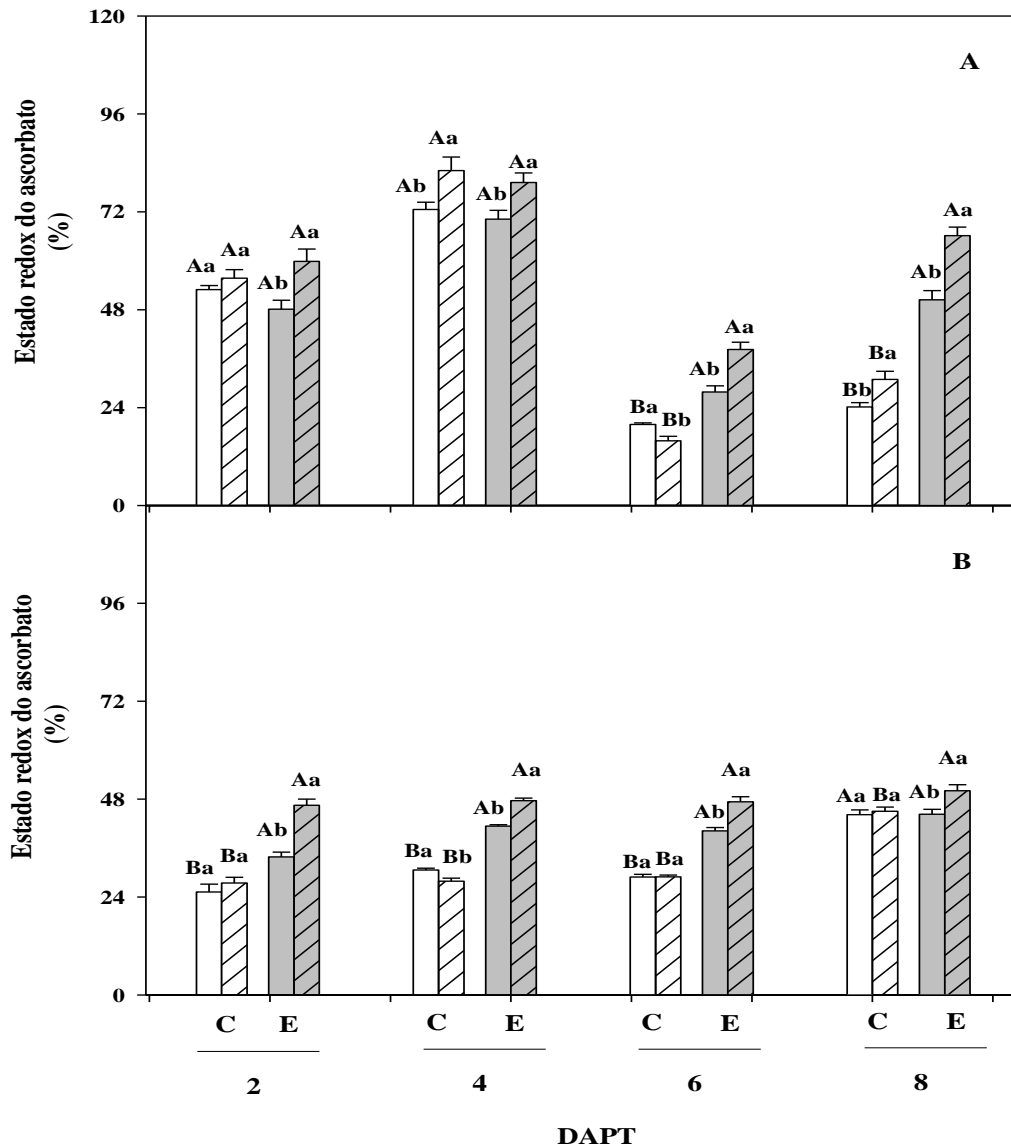


Figura 25 - Estado redox do ascorbato [AsA/ (AsA + DHA)] no endosperma (A) e no eixo embrionário (B) de plântulas de pinhão-mansão aos 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M (com hachura) e semeadas em condições controle (C - colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E - colunas cinza). Dentro de cada DAPT, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, em um mesmo pré-tratamento, ou minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

estudado seu valor tenha aumentado, em média, cerca de 66%, em relação aos dos demais tempos estudados.

4.2.7. Expressão gênica das enzimas catalase e glutatona redutase

4.2.7.1. Qualidade do RNA extraído e do cDNA produzido

A concentração e as razões de absorvâncias das amostras de RNA extraídos de eixos embrionários de plântulas de pinhão-manso aos 1, 2, 4, 6 e 8 DAPT são mostradas na Tabela 9. As relações entre as leituras de absorvância em 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e entre 260 nm e 230 nm (A_{260}/A_{230}) variaram, de acordo com o pré-tratamento ou condição de germinação, de 2,07 a 2,15 e de 1,98 a 2,35, respectivamente. Esses valores representam ausência de contaminações por proteínas e/ou carboidratos nas amostras, o que indica a boa qualidade do RNA extraído e garantia de sua utilização nas análises posteriores. Em adição, a concentração média do RNA variou entre 0,97 e 5,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, concentração suficiente para a obtenção do cDNA para as análises de expressão gênica.

Por meio de eletroforese em gel de agarose, foi possível avaliar a integridade do RNA (Figura 26A) e a qualidade do cDNA (Figura 26B). O RNA extraído estava íntegro, devido à visualização do padrão de bandas ribossomais (RNAr 28S e RNAr 18S) e cloroplastidiais (RNAcP). A amplificação eficiente do gene PP2 α por PCR semiquantitativa indica uma boa qualidade dos cDNAs obtidos por transcrição reversa.

4.2.7.2 Temperatura de anelamento dos iniciadores por qPCR

Com base na realização de um gradiente, a melhor temperatura de anelamento de cada *primer* foi escolhida. As temperaturas selecionadas para cada par de *primers*, incluindo os dos genes constitutivos e os dos genes alvos, variaram entre 57,5 e 61,9°C. A tabela 10 mostra as temperaturas de anelamento dos *primers* selecionados para a realização dos ensaios de RT-qPCR.

4.2.7.3. Perfil de expressão gênica da CAT e GR por qPCR

O padrão de expressão gênica das enzimas CAT e GR, envolvidas no metabolismo oxidativo, revelou que todos os genes testados foram funcionais. Vale destacar que, para a análise da expressão relativa desses genes, a amostra que corresponde ao controle não pré-tratado, em todos os DAPT, foi utilizada como calibrador interno, sendo atribuída a esta, o valor 1 de expressão relativa.

Tabela 9 - Razões de leituras de absorvância entre 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e entre 260 nm e 230 nm (A_{260}/A_{230}) e concentrações de RNA total, em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, extraídos de eixos embrionários de plântulas de pinhão-mansão aos 1, 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) das sementes com água destilada (H_2O) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a $75 \mu\text{M}$, e semeadas em condições controle (água destilada) ou de estresse salino (NaCl a 100 mM).

Amostras	Pré-tratamento	H ₂ O		NPS	
	Condição	Controle	Estresse	Controle	Estresse
1 DAPT	Razão A_{260}/A_{280}	2,14	2,12	2,14	2,14
	Razão A_{260}/A_{230}	2,24	2,34	2,41	1,98
	[RNA total]	3,38	1,41	1,10	0,97
2 DAPT	Razão A_{260}/A_{280}	2,15	2,10	2,15	2,07
	Razão A_{260}/A_{230}	2,35	2,30	2,34	2,21
	[RNA total]	3,21	2,17	3,39	5,11
4 DAPT	Razão A_{260}/A_{280}	2,08	2,08	2,07	2,08
	Razão A_{260}/A_{230}	2,25	2,29	2,02	2,30
	[RNA total]	2,22	2,08	2,09	1,63
6 DAPT	Razão A_{260}/A_{280}	2,09	2,10	2,10	2,08
	Razão A_{260}/A_{230}	2,31	2,27	2,18	2,24
	[RNA total]	1,37	1,34	1,34	1,89
8 DAPT	Razão A_{260}/A_{280}	2,10	2,10	2,10	2,12
	Razão A_{260}/A_{230}	2,30	2,25	2,19	2,30
	[RNA total]	1,45	1,55	2,02	1,76

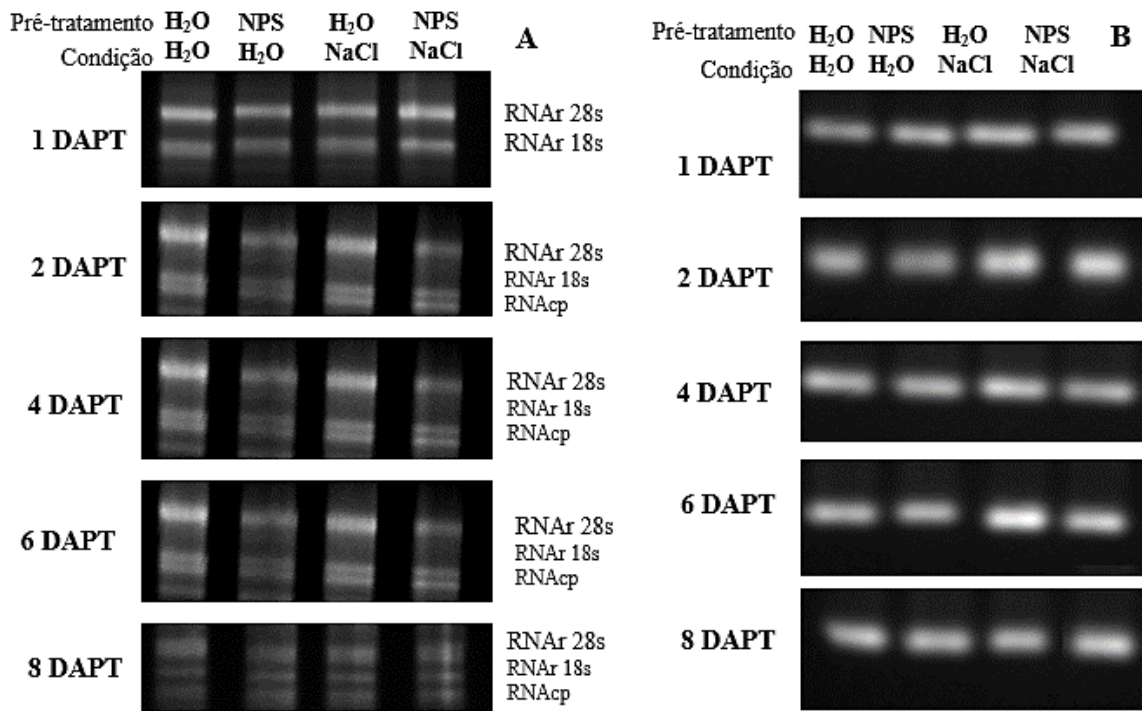


Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose, evidenciando as bandas de RNA ribossomal (RNAr 28S e RNAr 18S) e cloroplastidial (RNAcP) (A) e evidenciando os produtos de amplificação por PCR semiquantitativa (cDNA) (B). As amostras foram extraídas de eixos embrionários de plântulas de pinhão-mansão aos 1, 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (H₂O) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 µM, e semeadas em condições controle (água destilada) ou de estresse salino (NaCl a 100 mM).

Tabela 10 – Valores de temperatura de anelamento selecionadas para os genes de referência e genes alvos por qPCR.

Genes	Temperaturas selecionadas
ACT11	57,5°C
MPK4	61,9°C
GADPH	57,5°C
CAT1	59,8°C
CAT2	57,5°C
CAT3	57,5°C
GR1	59,8°C
GR2	57,5°C

O perfil de expressão gênica da CAT foi avaliado através de suas três isoformas: CAT1, CAT2 e CAT3 (Figura 27). A CAT1 teve maior expressão com 1 DAPT, sendo induzida tanto pela salinidade, quanto principalmente pelo pré-tratamento com NPS. Tal aumento foi substancial, em condições salinas mediadas pelo pré-tratamento com NPS, onde a expressão da CAT1 foi 327% superior àquela do calibrador interno. Aos 8 DAPT, a expressão relativa da CAT1 foi aumentada pelo pré-tratamento apenas em condições controle.

A CAT2 também foi teve sua expressão aumentada com 1 DAPT, tendo sido induzida, tanto pela salinidade, quanto pelo pré-tratamento com NPS (Figura 27B). Tal indução foi ainda mais pronunciada pelo fato dessa isoforma ter sido aumentada, em relação ao calibrador, pelo pré-tratamento com NPS em 298%, sob condições controle, e em 426%, sob condições de estresse salino. Tal isoforma teve, também, sua expressão relativa aumentada pelo pré-tratamento em condições salinas, aos 4 DAPT. Enquanto que, aos 6 DAPT, isso ocorreu apenas em virtude da salinidade. Já aos 8 DAPT, o pré tratamento com NPS, sob condições controle, induziu um pequeno aumento na expressão de CAT2, porém em níveis mais baixos do que os observados no 1º DAPT (Figura 27B).

A CAT3, foi aquela que menos foi expressa dentre as três isoformas. Os níveis de transcritos de CAT3 foram aumentados pelo pré-tratamento com NPS, tanto em condições

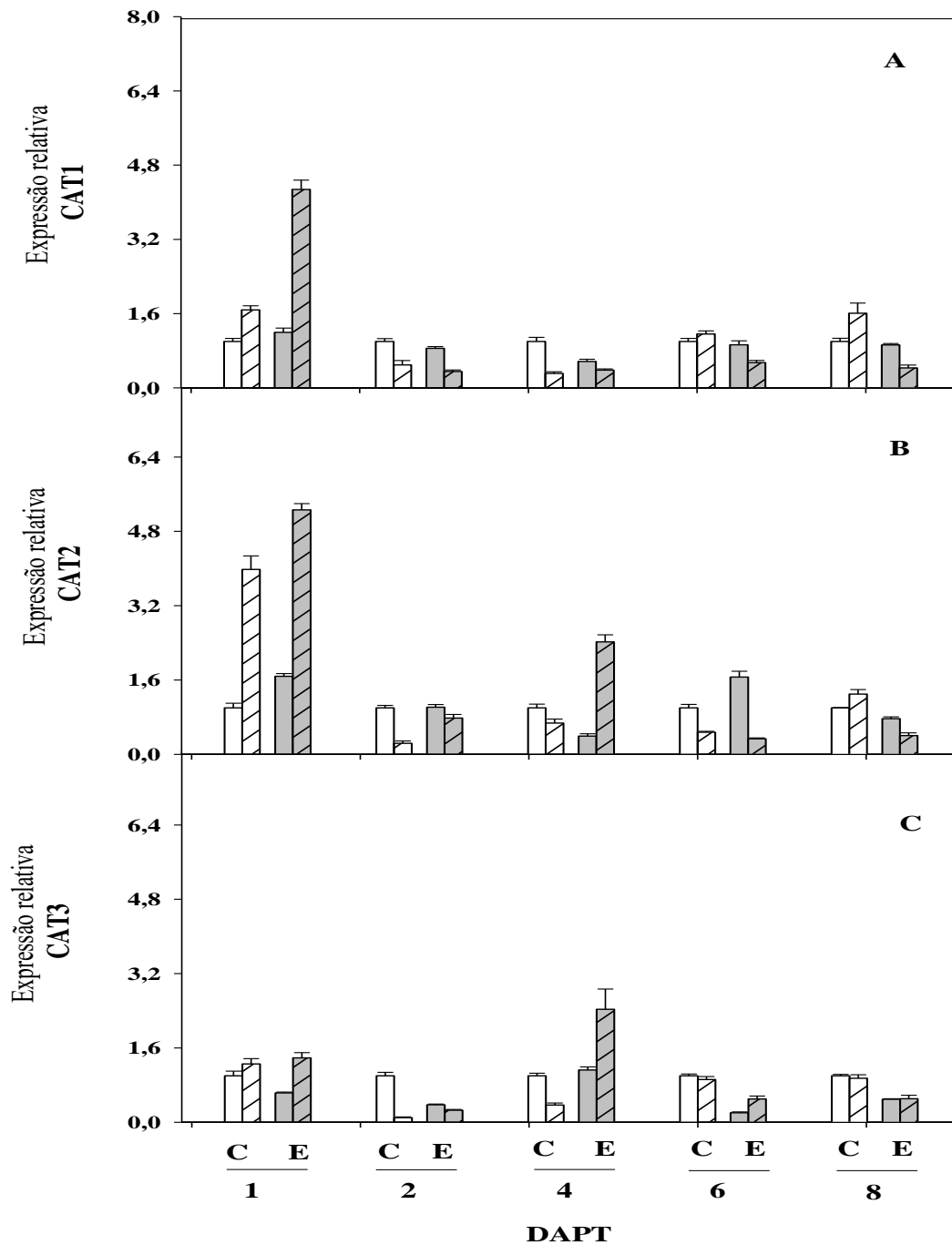


Figura 27 - Expressão gênica relativa das isoformas da catalase [CAT1 (A), CAT2 (B) e CAT3 (C)] de no eixo embrionário de plântulas de pinhão-manso aos 1, 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M (com hachura) e semeadas em condições controle (C- colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E- colunas cinzas). A amostra pré-tratada com água destilada, e sob condições controle, foi utilizada como calibrador interno para o cálculo da expressão relativa.

controle, quanto em condições salinas, no 1º DAPT, enquanto que aos 4 DAPT os aumentos propiciados pelo pré-tratamento ocorreram apenas em virtude do estresse salino.

A expressão gênica da GR foi avaliada através das isoformas, GR1 e GR2 (Figura 28). Assim como as isoformas CAT1 e CAT2, as isoformas da GR também tiveram maior expressão nos estágios iniciais de germinação (1 DAPT), principalmente no pré-tratamento com NPS sob condições salinas. No 1º DAPT, os níveis de transcritos de GR1 foram regulados positivamente (*upregulation*) pelo pré-tratamento com NPS sob condições controle (aumento de 80%) e sob condições de estresse salino (aumento de 220%) (Figura 28A). A GR1, também teve sua expressão relativa mais tardiamente (aos 8 DAPT) aumentada pelo pré-tratamento com NPS, sob condições controle, sendo o nível de transcrito 230% superior ao do calibrador interno. Além disso, essa isoforma também teve sua expressão mais tardiamente aumentada pela salinidade aos 8 DAPT.

A expressão relativa da isoforma GR2 teve comportamento semelhante ao da GR1 (Figura 28B). No início da germinação (1 DAPT), os níveis de transcritos de GR2 foram aumentados tanto pela salinidade, quanto pelo pré-tratamento; esses aumentos foram de 65% em plântulas sob condições de estresse e não pré-tratadas com NPS; de 245% em plântulas pré-tratadas e sob condições controle; e de 461% em plântulas pré-tratadas e sob condições de estresse. Além disso, os níveis de transcritos da GR2 também foram tardiamente regulados (aos 8 DAPT) pelo pré-tratamento com NPS sob condições controle, tendo sido 163% superior àqueles do calibrador interno.

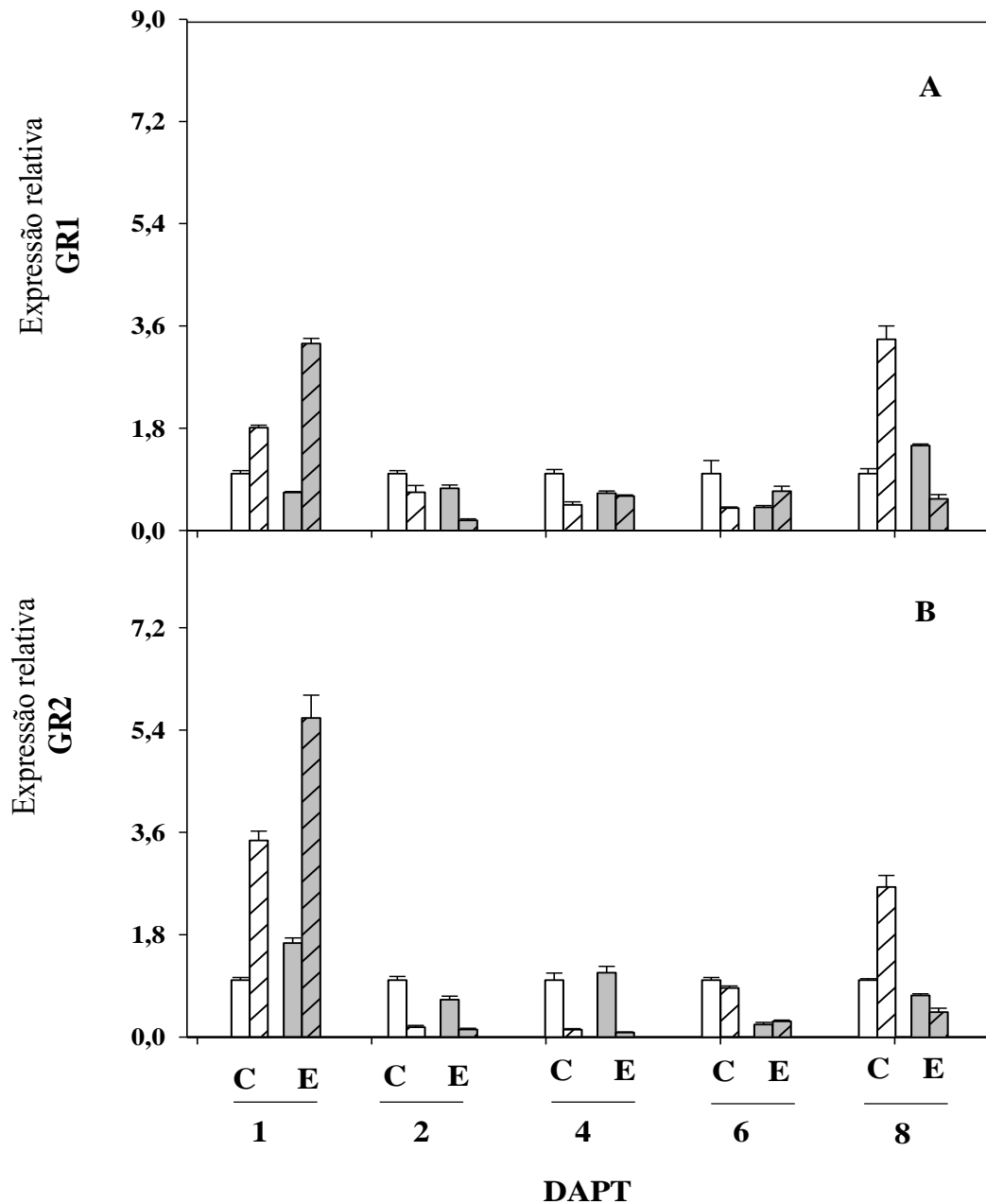


Figura 28 - Expressão gênica das isoformas 1 e 2 da redutase da glutatona (GR1, A; GR2, B) no eixo embrionário de plântulas de pinhão-mansão aos 1, 2, 4, 6 e 8 dias após o pré-tratamento (DAPT) com água destilada (sem hachura) ou com nitroprussiato de sódio (NPS) a 75 μ M (com hachura) e sementes em condições controle (C- colunas brancas) ou de estresse salino com NaCl a 100 mM (E- colunas cinzas). A amostra pré-tratada com água destilada, e sob condições controle, foi utilizada como calibrador interno para o cálculo da expressão relativa.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, estudou-se o efeito do nitroprussiato de sódio (NPS) no processo de aclimatação de plântulas de pinhão-manso ao estresse salino. Essa molécula, espontaneamente, libera óxido nítrico (NO), o qual é conhecido por induzir aclimatação de plantas a estresses bióticos e abióticos (QIAO; FAN, 2008; SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011; MISRA; MISRA; SINGH, 2011). Tendo em vista que essa resposta depende da espécie e da concentração de NPS (HUA, WEN-BIAO; LUNG-LAI, 2003; SUNG e HONG, 2010; WANG *et al.*, 2013; MARQUES, 2013), um experimento preliminar (Experimento I) foi realizado para testar a melhor concentração de NPS na germinação e no estabelecimento das plântulas de pinhão-manso, analisando-se também os teores dos íons Na^+ e K^+ e de TBARS.

5.1. Experimento I

Neste experimento, verificou-se que o estresse salino (NaCl a 100 mM) teve efeito deletério sobre a germinação de sementes de pinhão-manso, fato esse demonstrado pelas alterações negativas nas variáveis germinativas (Tabelas 5 e 6). As reduções na percentagem de germinação (%G) (nos estágios iniciais de desenvolvimento) e no índice de velocidade de germinação (IVG), bem como o aumento no tempo médio de germinação (TMG), foram respostas semelhantes às encontradas por Gao *et al.* (2008), Andréo-Souza *et al.* (2010) e Alencar (2014), trabalhando também com pinhão-manso. De acordo com Bewley *et al.* (2013), um aumento na concentração de sais no substrato gera uma redução do potencial hídrico, o que ocasiona uma menor capacidade das sementes de absorver água, inibindo a germinação e o crescimento inicial das plantas.

O pré-tratamento das sementes, por 24 horas com NPS, principalmente na concentração de 75 μM , foi capaz de reverter parcialmente os efeitos deletérios causados pela salinidade nas variáveis de germinação (Tabelas 5 e 6). A ação positiva do NPS sobre a germinação do pinhão-manso frente ao estresse salino foi concordante com diversos trabalhos na literatura, utilizando outras espécies e outros tipos de estresse (SARATH *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010). A %G, aos 8 DAPT, não foi afetada pelo pré-tratamento com NPS (Tabela 5) porque a partir do 5º DAPT dia houve uma tendência de estabilização da germinação, sendo esse fato também observado por Silva (2007).

A salinidade, segundo Voigt *et al.* (2009), causa um atraso ou diminuição da mobilização de reservas. Situação idêntica ocorreu neste experimento, no qual se pôde observar

que a matéria seca do endosperma das plântulas, sob condições salinas, foi maior naquelas do controle e cujas sementes não foram pré-tratadas com NPS (Figura 2A). Além disso, a salinidade causou uma diminuição da matéria seca do eixo embrionário, confirmando que o estresse salino inibe a mobilização das reservas da semente. Os resultados aqui encontrados são também concordantes com os observados por outros pesquisadores trabalhando com sementes oleaginosas, como o pinhão-manso (ALENCAR, 2014) e o girassol (ARAÚJO, 2013). Porém, quando as sementes de pinhão-manso foram pré-tratadas com NPS, nas concentrações de 75 e 100 μM , os efeitos danosos da salinidade foram minimizados, principalmente na primeira. Em *Sesbania virgata*, o NPS induziu a degradação de reservas germinativas e pós-germinativas (rafinose, galactomanano e proteínas) (ZERLIN, 2011). O efeito positivo do NO na mobilização de reservas foi encontrado também por Zheng *et al.* (2009) e Egbich *et al.* (2014).

As medidas de comprimento da parte aérea e da radícula (Figura 3), da mesma forma que as de matéria seca do eixo embrionário (Figura 2B), também foram reduzidas pela salinidade, e o pré-tratamento com NPS a 75 μM foi o mais eficiente em reverter essa inibição no crescimento. Portanto, o pré-tratamento com NPS a 75 μM , ao melhorar a mobilização de reservas, favorece o crescimento do eixo embrionário, e permite que os nutrientes sejam utilizados nesse órgão, servindo como fonte de energia para manter o metabolismo, e/ou como matéria para a construção dos tecidos vegetais (BUCKERIDGE *et al.*, 2004; GALLÃO *et al.*, 2007).

As maiores reduções na matéria seca e no comprimento do eixo embrionário, associadas às menores %G aos 2, 3 e 4 DAPT (Tabela 6; Figuras 2 e 3) pelo pré-tratamento com NPS a 200 μM , principalmente sob condições salinas, demonstram que essa molécula liberadora de NO teve efeito tóxico, fato também observado por Zhang *et al.* (2006) e Chaki *et al.* (2011). Portanto, os resultados observados confirmam que as respostas das plantas ao NPS (ou ao NO liberado) são dependentes de sua concentração (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011).

Os resultados sobre os teores dos íons K^+ e Na^+ no endosperma e no eixo embrionário, principalmente nesse último, apontam que o pré-tratamento com NPS a 75 μM , sob condições salinas, foi, dentre as concentrações testadas, a que menos aumentou o valor da relação Na^+/K^+ . Isto pode ser deduzido pelo fato dos teores de K^+ terem se mantido inalterados, pela salinidade, nos tratamentos com NPS a 50, 75 e 100 μM (Figura 4B), e os de Na^+ terem aumentado menos com o NPS a 75 μM do que nas outras concentrações testadas (Figura 5B). Esses resultados estão de acordo com estudos recentes, que apontam a importância da regulação da homeostase iônica como um mecanismo relevante para a tolerância ao estresse salino (ZHAO *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2011; ANJANEYULU *et al.*, 2014)

Neste estudo, o estresse salino induziu danos oxidativos ao pinhão-manso, o que foi possível constatar pelo aumento nos teores de TBARS, no eixo embrionário, de plântulas oriundas de sementes não pré-tratadas com NPS (Figura 6B). Segundo Gossett *et al.* (1994) à medida que há um aumento dos níveis de sais, há um aumento também da peroxidação lipídica. Embora no eixo embrionário o NPS tenha revertido os aumentos em TBARS pela salinidade, e independentemente da concentração testada, no endosperma isso somente aconteceu na concentração de 75 μM (Figura 6), resultado que sugere ser esse tratamento o mais efetivo na proteção contra os danos oxidativos. Estudos recentes têm revelado o papel benéfico de compostos liberadores de NO na minimização dos danos oxidativos causados pelo estresse salino (LEE *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2012; EGBICHI *et al.*, 2013 e EGBICHI *et al.*, 2014). Marques (2013) afirma que os efeitos benéficos do NPS contra os danos oxidativos podem ocorrer pela redução dos teores de ROS, bem como pela indução da expressão de genes relacionados à defesa oxidativa.

5.2. Experimento II

Diante dos resultados obtidos no Experimento I, a concentração de 75 μM de NPS foi a escolhida para a realização desse novo experimento (Experimento II), o qual teve por finalidade confirmar os resultados observados no anterior e ampliar os estudos do pré-tratamento das sementes com NPS na fisiologia, bioquímica e biologia molecular das plântulas de pinhão-manso sob condições de estresse salino.

Com relação às variáveis de germinação, os resultados foram condizentes com os do Experimento I, quando comparados na mesma concentração de NPS (75 μM), porém com algumas diferenças. Enquanto no Experimento I a redução no IVG pela salinidade foi completamente revertida pelo pré-tratamento com NPS a 75 μM , no experimento presente ela foi parcialmente revertida, ou seja: a salinidade reduziu o IVG em 57% em ausência do pré-tratamento com o NPS, porém na presença desse composto, a redução foi de apenas 34% (Tabela 7). No Experimento I, aos 3 e 4 DAPT, a inibição na %G pelo estresse salino, observada aos 2 DAPT, foi totalmente revertida pelo pré-tratamento com NPS a 75 μM (Tabela 6), enquanto no Experimento II essa reversão foi parcial, ou seja, ao invés de 34%, ela foi reduzida para apenas 18% no tratamento com NPS (aos 3 DAPT), e ao invés de 20%, ela foi reduzida para somente 9% aos 4 DAPT (Tabela 8). Nesse segundo experimento, também houve uma melhora sensível no TMG; enquanto na ausência de pré-tratamento com NPS essa variável

aumentou 82% em função da salinidade, na presença de NPS, esse aumento foi de apenas 29%, nessa mesma condição, indicando uma germinação mais rápida.

Portanto, da mesma forma que o ocorrido no primeiro experimento, a salinidade afetou negativamente a germinação das sementes, dados condizentes aos encontrados por Gao *et al* (2008) e Andréo-Souza *et al* (2010), que observaram alterações tanto na germinação como na curva de embebição das sementes de pinhão-manso, sob concentrações crescentes de NaCl.

O pré-tratamento com NPS estimulou a germinação do pinhão-manso, especialmente nos dias iniciais da germinação, concordando com os resultados de Silva (2007), em que a germinação do arroz sob efeito de várias concentrações de NPS foi significativamente alterada apenas 48 h após a embebição e se manteve inalterada após esse período. O NPS reduziu a inibição da germinação de sementes de baixo vigor, ao aumentar a %G, o IVG e a condutividade elétrica, demonstrando o papel crucial desse composto para a qualidade de sementes de *Plathymenia reticulata* (PEREIRA *et al.*, 2010). Pode-se, então, afirmar que esse composto foi importante para o aumento da tolerância dessas plantas ao estresse salino, pois segundo Alencar (2014), a capacidade de germinar em condições de estresse salino indica a existência de tolerância à salinidade, nessa fase de desenvolvimento.

O estudo sobre a mobilização das reservas da semente de pinhão-manso, ao longo da germinação e do estabelecimento da plântula (aos 2, 4, 6 e 8 DAPT), confirmou que a salinidade inibe ou retarda esse processo (Figura 7), e que o pré-tratamento com o NPS a 75 μM , pelo menos em parte, reverte essa inibição. Tais resultados, com pequenas diferenças, foram compatíveis com o realizado no Experimento I, e confirmam o efeito benéfico do NPS nesse processo. Além disso, eles são consistentes, pois em todos os dias analisados o efeito inibitório da salinidade no esgotamento da matéria seca do endosperma e no aumento da matéria seca do eixo embrionário foi revertido, pelo menos em parte, pelo pré-tratamento com NPS. Esses resultados estão de acordo com os observados por Zheng *et al* (2009), trabalhando com trigo, que reportaram que, sob estresse salino, o NPS causou diminuição da matéria seca da semente e um consequente aumento da matéria seca do coleóptilo e da radícula. Em soja, a suplementação com NO, sob condições de salinidade, causou um aumento da matéria seca da raiz, dos brotos e dos nódulos, em comparação àquelas que não haviam sido suplementadas (EGBICHI *et al.*, 2014).

O efeito benéfico do pré-tratamento das sementes com NPS a 75 μM , em condições de salinidade, também foi evidente quando se analisou o comprimento da parte aérea e da radícula ao longo da germinação e estabelecimento da plântula (Figura 8), resultado coerente com o do Experimento I com NPS a 75 μM (Figura 3). Os danos causados pela salinidade sobre a

germinação, o crescimento e o desenvolvimento de plântulas têm sido constatados em vários estudos com outras oleaginosas, como por exemplo: girassol (ASHRAF *et al.*, 2003); cajueiro anão-precoce (MARQUES *et al.*, 2011; MARQUES *et al.*, 2013); mamona (CAVALCANTI *et al.*, 2005); e soja (BERTAGNOLLI *et al.*, 2004; EGBICHI *et al.*, 2014). A redução do crescimento do pinhão-mansão propiciada pela salinidade já havia sido observada por Andréo-Souza *et al.* (2010), e essa redução foi ainda maior com o aumento da condutividade elétrica. Em mamona, o comprimento da raiz e do hipocótilo foram fortemente reduzidos à medida que se diminuiu o potencial osmótico da solução salina no qual a semente havia sido germinada (LOPES, 2013). Lin *et al.* (2012), em seus estudos com pepino, mostraram que o crescimento de hipocótilos e radículas foram significativamente diminuídos pelo estresse com NaCl a 100 mM, e essa inibição foi significativamente melhorada pela aplicação de NPS a 100 μ M. Em adição, alguns trabalhos têm relacionado o crescimento promovido pelo NPS, com o alongamento celular proporcionado pelos efeitos da auxina, e com a alteração dos compostos de parede celular (BETHKE *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2005; BOHM *et al.*, 2010; ZERLIN, 2011)

No eixo embrionário, os teores de K^+ permaneceram praticamente constantes ao longo da germinação, independentemente do pré-tratamento ou das condições de germinação, embora, no endosperma, os teores desse íon tenham mostrado tendência de queda com a germinação, especialmente em condições controle e sem o pré-tratamento com NPS (Figura 10). Esses resultados foram compatíveis com os observados no Experimento I, em que os níveis desse íon se mantiveram quase similares nos tratamentos com NPS de 0 a 100 μ M (Figura 4). A manutenção dos teores desse íon no eixo embrionário pode ser explicada, tendo em vista que eles foram expressos com base na matéria seca, que por sua vez aumentou ao longo da germinação (Figura 7). Assim, o possível decréscimo nos teores desse íon provocado pelo aumento da massa seca do eixo embrionário foi compensado pelo K^+ que foi translocado do endosperma para esse tecido. Esses resultados estão de acordo com os observados por Alencar (2014), que observou poucas alterações nos teores de K^+ em virtude da salinidade.

Os aumentos nos teores dos íons Na^+ e Cl^- , tanto no endosperma, como no eixo embrionário, ao longo da germinação (Figuras 11 e 12), e os consequentes efeitos negativos desses íons na germinação e no desenvolvimento das plantas foram também descritos por Lopes (2013), Marques *et al.* (2013), Silva *et al.* (2009) e Ashraf *et al.* (2003), em estudos com mamona, cajueiro anão-precoce, pinhão-mansão e girassol, respectivamente. Segundo Zhu (2001) e Munns (2002), a absorção de íons tóxicos (principalmente Na^+ e Cl^-) pode causar distúrbios fisiológicos na planta. Além disso, os resultados observados nesse experimento com

relação ao íon Na^+ estão de acordo com os do Experimento I (Figura 5), que mostraram aumentos nos teores desse íon devidos à salinidade.

Em geral, o pré-tratamento das sementes com NPS a 75 μM diminuiu significativamente o acúmulo dos íons Na^+ e Cl^- em função da salinidade e ao longo da germinação, tanto no endosperma, quanto no eixo embrionário (Figuras 11 e 12). Tais resultados, pelo menos com relação ao Na^+ , também foram concordantes com aqueles do Experimento I (Figura 5), onde os teores desse íon foram menos elevados pela salinidade no pré-tratamento com NPS a 75 μM . A redução no acúmulo de íons tóxicos pelo pré-tratamento com NPS pode, pelo menos em parte, ser responsável pelas melhoras na germinação e no estabelecimento das plântulas de pinhão-manso, sob condições de salinidade. Alguns autores mostraram, também, que a aplicação de NPS, melhora a homeostase K^+/Na^+ em plantas submetidas à salinidade, aumentando assim a tolerância a esse estresse (ZHANG *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2009). Zhang *et al.* (2006), demonstrou em seu trabalho com plântulas de milho, que o NO promoveu tolerância a essa espécie pelo aumento da atividade do transportador do tipo antiporte Na^+/H^+ do tonoplasto. Em plantas de mostarda, sob estresse salino, o tratamento com NPS propiciou menor acúmulo de Na^+ e taxas aumentadas de K^+ , entretanto ao associar um inibidor de NO, esses efeitos positivos foram revertidos, provando que de fato o NO liberado pelo NPS estava envolvido na indução dessas respostas (KHAN *et al.*, 2012).

Da mesma forma que o observado no Experimento I (Figura 6), a salinidade aumentou os teores de TBARS no eixo embrionário em todos os tempos de germinação analisados (Figura 13). Também, em concordância com o referido experimento, o NPS a 75 μM reverteu quase que completamente esse aumento. Esse efeito do NPS também foi encontrado por Santos (2009), que observou que a peroxidação lipídica em raízes aumentou 54% no tratamento salino, entretanto quando este foi associado ao NPS, o aumento na peroxidação lipídica foi de apenas 14%. Plantas submetidas à salinidade tem sua peroxidação lipídica aumentada devido a oxidação dos lipídios pelo H_2O_2 (SEKMEN *et al.*, 2007). Portanto, o acúmulo de TBARS ou de malondialdeído (MDA), em geral decorrentes da peroxidação lipídica, tem sido usado como indicador de injúrias causadas pelo estresse oxidativo (SAIRAM; RAO; SRIVASTAVA, 2012), o qual, por sua vez, é um estresse secundário gerado pela salinidade (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003). No endosperma, os aumentos nos teores de TBARS não foram tão evidentes quanto no eixo embrionário, porém, em ambos os tecidos, eles se mostraram decrescentes ao longo da germinação (Figura 13). É possível que isso tenha ocorrido em função da ativação do sistema de defesa antioxidativa, enzimática ou não enzimática, para eliminar as ROS (SANG *et al.*, 2008; LIN *et al.* 2012; EGBICHI *et al.*, 2014).

Houve concordância entre o comportamento dos teores de H_2O_2 (uma ROS), e os de TBARS ao longo da germinação, que também aumentaram em função da salinidade, mas, pelo menos em parte, tais aumentos foram revertidos pelo pré-tratamento com NPS, especialmente no eixo embrionário (Figuras 13 e 14). Esses resultados reforçam a idéia de que o estresse salino gera um estresse oxidativo, aumentando a produção de ROS, cujo acúmulo nas células pode gerar danos a proteínas, ácidos nucleicos e lipídios essenciais para a estrutura da membrana plasmática (MILLER *et al.*, 2010). Por outro lado, sugerem que o pré-tratamento com NPS a 75 μ M contribuiu, pelo menos em parte, para a eliminação do H_2O_2 celular gerado (ou possivelmente de outras ROS) pela salinidade, aliviando as injúrias impostas pelo estresse, e dessa forma melhorando a germinação, a mobilização de reservas e o conseqüente crescimento das plântulas, como observado nos dois experimentos realizados. Diversos autores também demonstraram a eficácia do NPS na redução dos teores de ROS em plantas sob estresse (SHI *et al.*, 2007; SUNG; HONG, 2010; XU *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2011).

Em resumo, os dados descritos até o momento indicam que o NPS induziu a aclimação de plântulas de pinhão-manso ao estresse salino, e essa aclimação deveu-se, provavelmente, à existência de um sistema antioxidativo eficiente. De acordo com Gill *et al.* (2013), estresses ambientais, incluindo a salinidade, causam estresse oxidativo, devido a uma produção excessiva de ROS, as quais são altamente reativas e tóxicas para as células. Entretanto, as plantas possuem enzimas antioxidativas que são importantes componentes na eliminação dessas ROS nas células (APEL; HIRT, 2004; ASHRAF, 2009; SUZUKI *et al.*, 2012).

Com a finalidade de investigar a ação do sistema de defesa enzimática na proteção contra os danos oxidativos das plântulas do pré-tratamento com NPS, foram estudadas as atividades das enzimas SOD, CAT, APX, GPX e GR, ao longo da germinação, tanto no endosperma quanto no eixo embrionário (Figuras 15-18). A SOD, enzima responsável pela eliminação do radical superóxido, produzindo H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010), teve, sua atividade aumentada no eixo embrionário pelo pré-tratamento com NPS, tanto em condições controle, como de estresse salino, exceto aos 4 DAPT (Figura 15). Esse aumento de atividade no eixo embrionário sugere que a SOD desempenha um papel importante na aclimação das plântulas de pinhão-manso à salinidade, como também foi sugerido por Hu *et al.* (2012), apesar de no endosperma esse aumento só ter ocorrido sob condições controle. Porém, levando em conta somente o efeito do estresse salino, essa enzima manteve níveis de atividade iguais ou abaixo do controle por quase todo o período estudado, apresentando apenas um aumento no final do período experimental. Esses resultados são, pelo menos em parte, discordantes com os

observados por Silva *et al.* (2013) e Gao *et al.* (2008), no qual houve um aumento significativo da atividade da SOD em virtude do estresse salino.

A atividade da APX foi estimulada pelo pré-tratamento com NPS sob estresse salino, exceto no 4º DAPT, porém os valores foram inferiores àqueles encontrados sob condições controle (Figura 17). Já a GPX não teve sua atividade estimulada pelo pré-tratamento com NPS no eixo embrionário das plântulas sob condições de salinidade (Figura 18). Tendo em vista isso, essas duas peroxidases, provavelmente não devem ter tido uma contribuição significativa no processo de aclimação promovido pelo NPS.

Dentre as enzimas estudadas, a GR foi a que apresentou comportamento mais consistente ao longo da germinação, em ambos os tecidos estudados (Figura 19). O fato de sua atividade ter sido estimulada pelo pré-tratamento com NPS, tanto no endosperma quanto no eixo embrionário das plântulas sob salinidade, e em todos os períodos de tempos analisados, sugere que essa enzima contribuiu para a aclimação das plântulas a esse estresse. A CAT, também parece ter desempenhado um papel relevante no processo de aclimação à salinidade, pois sua atividade foi estimulada pelo pré-tratamento com NPS no eixo embrionário das plântulas de pinhão-mansinho sob salinidade, nos estágios iniciais de germinação, 2 e 4 DAPT (Figura 16B). Além disso, é importante destacar que essa enzima, em relação à GR ou às duas peroxidases estudadas, apresentou valores de atividade muito mais elevados (da ordem de mais de 300 vezes). Portanto, a CAT parece ter sido a maior responsável pela eliminação do H₂O₂, e dessa forma contribuiu de maneira mais significativa no processo de aclimação ao estresse salino. A importância da CAT na remoção do H₂O₂ também foi demonstrada por Mhamdi *et al.* (2010). Gondim *et al.* (2012), demonstraram que o pré-tratamento com H₂O₂ induziu a aclimação de plantas de milho à salinidade, principalmente pelo aumento na atividade da CAT. É possível que, nos estágios iniciais de germinação e de desenvolvimento do eixo embrionário das plântulas de pinhão-mansinho sob estresse salino, a atividade da CAT seja suficiente para a remoção do excesso do H₂O₂, não havendo necessidade de expressão dessa enzima nos estágios finais de estabelecimento das plântulas (6 e 8 DAPT).

Portanto, os resultados apresentados sugerem que, dentre as enzimas antioxidativas estudadas, a CAT, a SOD e a GR parecem ter sido as principais responsáveis pela proteção contra os danos oxidativos gerados pela salinidade, contribuindo assim para o aumento da tolerância aos sais promovido pelo pré-tratamento das sementes de pinhão-mansinho com NPS a 75 µM. Alguns estudos têm relacionado o aumento da atividade das enzimas antioxidativas e o acúmulo de antioxidantes não enzimáticos com o aumento da tolerância das plantas ao estresse salino (APEL; HIRT, 2004; ASHRAF, 2009; ; NABATI *et al.*, 2011; BHUTTA, 2011;

ANJANEYULU *et al.*, 2014). A ativação do sistema antioxidativo é benéfica para a performance das plantas sob estresse salino, pois uma capacidade adequada de enzimas antioxidantes e outros compostos com atividade antioxidante pode ajudar na remoção do excesso de ROS e pode inibir a peroxidação lipídica (WANG *et al.*, 2004). É importante ressaltar que no presente estudo o aumento da capacidade antioxidante propiciado pelo pré-tratamento com NPS esteve diretamente associado com a diminuição dos teores de H₂O₂ e TBRAS (peroxidação lipídica), em plântulas de pinhão-manso sob condições de estresse salino, assim como encontrado por Egbichi *et al.* (2013) em soja e por Khan *et al.* (2012) em mostarda.

A glutationa redutase (GR) desempenha um papel importante na defesa da célula contra as ROS por manter um *pool* de glutationa no estado reduzido (GSH), convertendo a glutationa oxidada (GSSG) em sua forma reduzida, com concomitante oxidação do NADPH (GILL *et al.* 2013). No presente estudo, o pré-tratamento com NPS aumentou os teores de GSH nos estágios iniciais de germinação (2 e 4 DAPT), tanto no endosperma como no eixo embrionário das plântulas sob salinidade (Figura 20). Por sua vez, nesses mesmos tempos, os teores de GSSG não foram reduzidos na mesma proporção por esse pré-tratamento (Figura 21), porém houve um substancial aumento no estado redox da glutationa apenas no endosperma (Figura 22). No eixo embrionário das plântulas sob salinidade, somente aos 4 e 6 DAPT é que houve um aumento significativo nesse estado redox promovido pelo NPS (Figura 22). Muitas evidências na literatura têm ligado a atividade da GR e o conteúdo de GSH com a modulação diferencial de vários estresses, principalmente devido à manutenção de um ambiente redutor na célula, conferindo às plantas tolerância ao estresse (GILL; TUTEJA, 2010; ANJUM *et al.*, 2012; TRIVED *et al.* 2013). A GSH também é importante devido a sua participação no processo de regeneração do ascorbato reduzido (AsA), através do ciclo do ascorbato-glutationa ou por poder reagir diretamente com as ROS, protegendo o ambiente celular dos efeitos danosos dessas moléculas (ASADA, 1994). O ciclo do AsA-GSH também desempenha um papel importante no controle da concentração de ROS (incluindo H₂O₂) em diferentes espécies sob estresse salino (INNOCENTI *et al.*, 2007; GILL; TUTEJA, 2010; ANJUM *et al.*, 2010; ANJUM *et al.*, 2012).

Apesar do NPS ter promovido, de modo geral, um aumento nos teores de ascorbato reduzido (AsA) sob condições salinas, tanto no endosperma como eixo embrionário (Figura 23), este não foi acompanhado por um correspondente decréscimo nos teores de ascorbato oxidado (desidroascorbato, DHA), exceto no endosperma no 2º DAPT (Figura 24). Mesmo assim, o pré-tratamento com NPS promoveu um aumento no estado redox do ascorbato das plântulas sob salinidade, ao longo de todo o período analisado (Figura 25). Então, o pré-tratamento das sementes com NPS a 75 µM parece promover o aumento da tolerância do

pinhão-mansão ao estresse salino, pelo menos em parte, por manter um ambiente redox adequado, permitindo o funcionamento normal da maquinaria celular. De acordo com Egbichi *et al.* (2013) e Lin *et al.* (2012), compostos doadores de NO induzem a capacidade antioxidativa de plantas de soja e pepino, respectivamente, através de aumentos significativos nos teores de GSH e AsA, sob condições de estresse salino. Alguns autores têm demonstrado o envolvimento do NO na síntese desses antioxidantes não enzimáticos (KSOURI *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010). Contudo, esses autores também afirmam que a estimulação da capacidade antioxidativa, mediada pelo NO, pode acontecer de duas maneiras: a primeira, devido à ativação da biossíntese desses antioxidantes, os quais podem ser responsáveis diretamente pela redução na peroxidação lipídica; e a segunda devido à estimulação de enzimas atuantes no ciclo do ascorbato-glutationa.

Diante disso, pode-se afirmar que o aumento nos teores de GSH, promovido pelo NPS nas plântulas sob salinidade (Figura 20) foi consistente com o correspondente aumento em atividade da GR (Figuras 19). E o aumento nos teores de AsA, promovido pelo NPS nas plântulas sob salinidade (Figura 23) foi consistente com o correspondente aumento em atividade da APX (Figuras 17).

Tendo em vista que o NO pode também atuar na proteção oxidativa, agindo como uma molécula sinalizadora por meio de uma cascata de eventos, que levam a mudanças na expressão gênica (LASPINA *et al.*, 2005), resolveu-se investigar seu efeito na expressão de duas das enzimas estudadas. Uma foi a CAT (e suas isoformas), dada sua importância na proteção oxidativa e resposta positiva ao pré-tratamento com NPS na aclimação das plântulas de pinhão-mansão à salinidade, além de ser a principal eliminadora de H₂O₂ dentre as enzimas estudadas. A outra foi a GR (e suas isoformas), que também respondeu de forma positiva ao pré-tratamento com NPS, e de forma altamente consistente durante todo o período estudado, além de seu envolvimento no estado redox da glutaciona, um antioxidante não enzimático. Tais estudos foram feitos para complementar e comprovar os resultados já obtidos.

A expressão dos genes das isoformas de catalase de eixos embrionários de plântulas de pinhão-mansão, com 1 DAPT, e sob condições de estresse salino (Figura 27), foi concordante com o aumento na atividade desta enzima, promovido pelo NPS nos estágios iniciais de germinação (Figura 16B). Portanto, tal aumento em atividade deveu-se, pelo menos em parte, à regulação transcricional, principalmente, das isoformas, CAT1 e CAT2, que foram as que apresentaram maiores valores de expressão relativa. Gondim *et al.* (2012) demonstraram que o aumento em atividade da catalase sob estresse salino, mediado pelo pré-tratamento com H₂O₂, foi correlacionado com o aumento de transcritos de mRNA dessa enzima devido à regulação da

expressão gênica nos estágios iniciais de germinação de sementes de milho. Por outro lado, o pré-tratamento com NPS também promoveu a expressão dos genes da CAT nas plântulas de pinhão-mansão sob condições controle, especialmente a da isoforma CAT2 (Figura 27B), porém isso não se relacionou com a atividade da CAT, não sendo observadas quaisquer alterações na atividade enzimática (Figura 16B). Embora tenha sido detectada expressão do gene da CAT3 por qPCR os valores de expressão relativa normalizados foram baixíssimos em comparação aos das outras isoformas. Assim, os resultados sugerem que esta isoforma da CAT não contribuiu significativamente para a atividade total desta enzima (Figura 16B).

A expressão dos genes das isoformas da GR de eixos embrionários de plântulas de pinhão-mansão, com 1 DAPT, e sob condições de estresse salino (Figura 28), foi concordante com o aumento na atividade desta enzima, promovido pelo NPS ao longo de todo o processo de germinação e estabelecimento das plântulas de pinhão-mansão analisado (Figura 19B). Portanto, tal aumento em atividade deveu-se, pelo menos em parte, à regulação transcricional das duas isoformas, GR1 e GR2, sendo esta última a que apresentou maiores valores de expressão relativa. Além disso, embora sob condições salinas, e em ausência de pré-tratamento com NPS, a atividade da GR tenha aumentado por todo o período experimental, os níveis de transcritos das duas isoformas foram muito pouco alterados. Esse fato demonstra a não correlação entre a atividade e os níveis de transcritos. Tais resultados, apenas com relação à expressão gênica, discordam dos encontrados por Hu *et al.* (2011), no qual o estresse salino induziu incrementos na expressão gênica da GR, bem como de outras enzimas do sistema de defesa antioxidativa. As mudanças na atividade dessa enzima podem não ter sido causadas pelos níveis de mRNA, mas sim por alterações pós-transcricionais, envolvendo o processamento do mRNA ou a síntese protéica (ZHAO *et al.*, 2014). Em adição, Medeiros *et al.* (2014) propõem que a atividade e a expressão relativa das enzimas antioxidantes podem nem sempre estar relacionadas.

A existência de correlação positiva entre a atividade das enzimas CAT, SOD e GPX e suas expressões relativas também foi demonstrada por Zhao *et al.* (2014). Esses autores demonstraram que a aclimação ao calor causou tolerância térmica à gramínea *Dactylis glomerata* L. devido à indução da atividade dessas enzimas e dos níveis dos seus transcritos, o que permitiu a redução da peroxidação lipídica e do vazamento de eletrólitos, bem como a minimização dos danos causados por esse estresse ao aparato fotossintético.

É importante destacar, que este estudo envolvendo a expressão gênica de enzimas do estresse oxidativo, em pinhão-mansão, é pioneiro. Embora haja estudos com essa espécie nessa área, eles envolvem outros genes, como por exemplo, o realizado por Alencar (2014) em

endosperma de plântulas, durante a germinação e estabelecimento da plântula, que observou uma correlação entre as alterações em atividade de duas enzimas do metabolismo dos lipídeos (lipase e liase do isocitrato) e suas expressões relativas. Já Rocha *et al.* (2013) estudou a expressão de peptidases de cisteína e de enzimas de processamento vacuolar, no integumento e no endosperma de pinhão-manso em vários estádios de desenvolvimento. Esses autores sugeriram que o padrão de expressão destas peptidases correlaciona-se com alterações anatômicas no integumento e endosperma celular, sugerindo assim um papel para ambas as classes de peptidases na morte celular programada e no processamento de proteínas, os quais ocorrem simultaneamente em cada um destes tecidos.

6. CONCLUSÕES

Os efeitos do pré-tratamento com NPS na germinação de sementes de pinhão-manso foram dependentes da concentração empregada, sendo a de 75 μM aquela em que as plântulas obtiveram melhor desempenho frente ao estresse salino.

O pré-tratamento das sementes com NPS a 75 μM induziu aclimatação à salinidade, principalmente por promover a melhora da germinação, da mobilização de reservas e do crescimento das plântulas de pinhão-manso, através de reduções no acúmulo de Na^+ e Cl^- , na peroxidação lipídica e nos teores de H_2O_2 , bem como pela indução do sistema antioxidante enzimático e aumento do estado redox do ascorbato e da glutatona.

O pré-tratamento com NPS foi eficiente na indução da aclimatação das plântulas de pinhão-manso ao estresse salino, nas condições estudadas principalmente por propiciar uma melhor homeostase iônica e redox.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTEN, W. M. J.; MAES, W. H.; REUBENS, B.; MATHIJS, E.; SINGHI, V. P.; VERCHOT, L.; MUYS, B. Biomass production and allocation in *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 667-676, 2010.

AHMAD, P.; JALEEL, C.A.; SALEM, M.A.; NABI, G.; SHARMA, S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 161-175, 2010.

ALEMAN, F.; NIEVES CORDONES, M.; MARTINEZ, V.; RUBIO, F. Root K⁺ acquisition in plants: the *Arabidopsis thaliana* model. **Plant Cell Physiology**, v. 52, p. 1603–1612, 2011.

ALENCAR, N. L. M. **Mobilização de reservas endospermicas de pinhão-mansão durante a germinação e desenvolvimento da plântula sob condições de estresse salino**. 2014. 120f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia molecular), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

ALKORTA I, HERNANDEZ-ALLICA J, BECERRIL JM, AMEZAGA I, ALBIZU I, GARBISU C. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. **Environmental Science Biotechnology**. v. 3, p. 71–90, 2004.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ANDRÉO-SOUZA, Y.; PEREIRA, A.L.; SILVA, F.F.S.S.; RIBEIRO-REIS, R.C.; EVANGELISTA, M.R.V.; CASTRO, R.D.; DANTAS, B.F. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 83-92, 2010.

ANJANEYLU, E.; REDDY, P. S.; SUNITA, M.; KISHOR, P. B. K.; MERIGA, B. Salt tolerance and activity of antioxidative enzymes of transgenic finger millet overexpressing a vacuolar H(+)-pyrophosphatase gene (SbVPPase) from *Sorghum bicolor*. **Journal of plant physiology**, v. 171, p. 789-798, 2014.

ANJUM, N.A.; UMAR, S.; CHAN, M.-T. (Eds.), *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*, Springer, 2010.

ANJUM, N. A.; AHMAD, I.; MOHMOOD, I.; PACHECO, M.; DUARTE, A.C.; PEREIRA, E.; UMAR, S.; AHMAD, A.; KHAN, N. A.; IQBAL, M.; PRASAD, M. N. V. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids e a review, **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, p. 307-324, 2012.

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

ARAÚJO, J. L. O. **Mobilização de reservas durante o crescimento pós-germinativo em girassol sob estresse salino e osmótico aplicados de forma isolada e combinada**. 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2013.

ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, v. 172, p. 876-887, 2007.

ARORA, A.; SAIRAM, R. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v. 82, 2002.

ARRUDA, F. O.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curca* L.) como alternativa para o semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.

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. p. 131–145.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology**, v. 27, p. 84–93, 2009.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, p. 1-11, 2006.

ASHRAF, M.; ZAFAR, R.; ASHRAF, M.Y. Time-course changes in the inorganic and organic components of germinating sunflower achenes under salt (NaCl) stress. **Flora**, v. 198, p. 26-36, 2003.

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.

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

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v. 210, p. 215-221, 2000.

BEN-MILED, D. D.; ZARROUK, M.; CHÉRIF, A. Sodium chloride effects on lipase activity in germinating rape seeds. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 899-902, 2000.

BERTAGNOLLI, C. M.; CUNHA, C. S. M.; MENEZES, S. M.; MORAES, D. M.; LOPES, N. F.; ABREU, C. M. Qualidade fisiológica e composição química de sementes de soja submetidas ao estresse salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, p. 287-291, 2004.

BETHKE, P. C.; GLUBER, F.; JACOBSEN, J. V.; JONES, R. L. Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, v. 219, p. 847-855, 2004.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. Structure and Composition. *In: Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. New York: Springer, 2013. p. 1-25.

BHERING, L. L.; BARRERA, C. F.; ORTEGA, D.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A.; ROSADO, T. B.; CRUZ, C. D. Differential response of *Jatropha* genotypes to different selection methods indicates that combined selection is more suited than other methods for rapid improvement of the species. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 260-265, 2013.

BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v.12, p.431-434, 2000.

BHUTTA W. M. Antioxidant activity of enzymatic system of two different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars growing under salt stress. **Plant Soil Environmental**, v. 57, p. 101–107, 2011.

BÖHM, F. M. L. Z.; FERRARESE, M. L. L.; ZANARDO, D. I. L.; MAGALHAES, J. R.; FERRARESE-FILHO, O. Nitric oxide affecting root growth, lignification and related enzymes in soybean seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 1039-1046, 2010.

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

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Acúmulo de reservas. *In*: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 31-50.

CAI, F.; MEI, L. J.; NA, X. L.; GAO, S.; TANG, L.; CHEN, F. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, p. 25-30, 2011.

CAVALCANTI, M. L. F.; FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. R.; BARROS JÚNIOR, G.; SOARES, F. A. L.; SIQUEIRA, E. C. Tolerância da mamoneira BRS 149 à salinidade: Germinação e características de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, p.57-61, 2005.

CHAKI, M.; VALDERRAMA, R.; FERNÁNDEZ-OCANA, A.; CARRERAS, A.; GÓMEZRODRÍGUEZ, M. V.; PEDRAJAS, J. R.; BEGARA-MORALES, J. C.; SÁNCHEZ-CALVO, B.; LUQUE, F.; LETERRIER, M.; CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B. Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1803–1813, 2011.

CHEN, Z.; POTTOSIN, I. I.; CUIN, T. A.; FUGLSANG, A. T.; TESTER, M. JHA, D.; ZEPEDA-JAZO, I.; ZHUO, M.; PALMGREN, M. G.; NEWMAN, I. A.; SHABALA, S. Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed Barley. **Plant Physiology**, v.145, p.1714-1725, 2007.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, v. 218, p. 900-905, 2004.

CRUZ DE CARVALHO, M. H. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. **Plant signaling & behavior**, v. 3, p. 156- 165, 2008.

DEINLEIN, U.; STEPHAN, A. B.; HORIE, T.; LUO, W.; XU, G.; SCHROEDER, J. I. Plant salt-tolerance mechanisms- Review. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 371-379, 2014.

DÍAZ-LÓPEZ, L.; GIMENO, V.; LIDÓN, V.; SIMÓN, I.; MARTÍNEZ, V.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F. The tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: an ecophysiological analysis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 34-42, 2012.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, v. 276, p. 1737-1745, 2009.

EASTMOND, P. J.; GERMAIN, V.; LANGE, P. R.; BRYCE, J. H.; SMITH, S. M.; GRAHAM, I. A. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 5669-5674, 2000.

EGBICHI, I.; KEYSTER, M.; JACOBS, A.; KLEIN, A.; LUDIDI, N. Modulation of antioxidant enzyme activities and metabolites ratios by nitric oxide in short-term salt stressed soybean root nodules. **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 326-333, 2013.

EGBICHI, I.; KEYSTER, M.; LUDIDI, N. Effect of exogenous application of nitric oxide on salt stress responses of soybean. **South African Journal of Botany**, v. 90, p. 131-136, 2014.

EPAMIG / FINEP. **Projeto Pinhão-manso: Relatório Final relativo ao 1º período encerrado a 31 de março de 1985**. In: EPAMIG. Coletâneas sobre pinhão-manso na EPAMIG. Belo Horizonte, 2005. Disponível em:

<http://www.epamig.br/informativo/pinhaomanso/.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2014.

FAO. **Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils**. Rome: FAO Land and Plant Nutrition Management Service, 2005.

FAN, H.; GUO, S.; JIAO, Y.; ZHANG, R.; LI, J. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. **Frontiers of Agriculture in China**, v. 1, p. 308-314, 2007.

FERREIRA, L. C.; CATANEO, A. C.; REMAEH, L. M. R.; CORNIANI, N.; DE FÁTIMA FUMIS, T.; DE SOUZA, Y. A.; SCAVRONI, J.; SOARES, B. J. A. Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants. **Pesticide Biochemistry Physiology**. v. 97, p. 47-54, 2010.

- FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; MILCZAREK, G.; ARASIMOWICZ, M.; CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, v. 224, p. 1363-1372, 2006.
- FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v. 49, p. 835-842, 2010.
- FOTOPOULOS, V.; DE TULLIO, M. C.; BARNES, J.; KANELLIS, A. K. Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 729–737, 2008.
- FOYER C. H.; HALLIWELL B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, v. 133, p. 21–25, 1976.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiology**, v. 155, p. 2-18, 2011.
- GAINES, T. P.; PARKER, M.B.; GASCHO, G.J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate extraction. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 371-374, 1984.
- GALLÃO, M. I.; VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; SOUZA, A. S. N.; DE BRITO, E. S. Reserve mobilisation in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2012-2018, 2007.
- GALLIE, D. R. The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. **Journal of Experimental Botany**, v.64, p. 433-443, 2013.
- GARBISU C, HERNANDEZ-ALLICA J, BARRUTIA O, ALKORTA I, BECERRIL JM. **Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas. Environmental Health**. v.17, p. 75–90, 2002.
- GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J.M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylene Orange complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p. 149-155, 1999.
- GHARS, M. A.; PARRE, E.; DEBEZ, A.; BORDENAVE, M.; RICHARD, L.; LEPORT, L.; BOUCHEREAU, A.; SAVOURÉ, A.; ABDELLY, C. Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.588-599, 2008.

GAO S.; OUYANG, C.; WANG, S.; XU, Y.; TANG, L.; CHEN, F. Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. **Plant Soil Environmental**, v. 54, p. 374–381, 2008.

GARA, L. DE; LOCATO, V.; DIPIERRO, S.; PINTO, M. C. DE. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 173, p. S13-19, 2010.

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

GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; HASANUZZAMAN, M.; GILL, R.; TRIVEDI, D. K.; AHMAD, I.; PEREIRA, E.; TUTEJA, N. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 204-212, 2013.

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.; MIRANDA, R. S.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO; J. T. Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H₂O₂ leaf spraying is associated with improved gas exchange rather than with non-enzymatic antioxidant system. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, p. 251-260, 2013.

GOSSETT, D. R.; MILLHOLLON, E. P.; LUCAS, M. C.; BANKS, S. W.; MARNEY, M. M. The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and saltsensitive cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Report**, v. 13, p. 498-503, 1994.

GOUVÊA, C. M. C. P.; SOUZA, J. F.; MAGALHÃES, A. C. N.; MARTINS, I. S. NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. **Plant Growth Regulation**, v. 21 p. 183–187, 1997.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, p. 207-212, 1980.

GUO, Y.; TIAN, Z.; YAN, D.; ZHANG, J.; QIN, P. Effects of nitric oxide on salt stress tolerance in *Kosteletzkya virginica*. *Life Science Journal*, v. 6, p. 67-75, 2009.

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

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 125, p. 385-395, 1968.

HELLER, J. **Physic nut (*Jatropha curcas* L.): promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.** Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, 1996. 66p.

HU, L.; LI, H.; PANG, H.; FU, J. Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, v. 169, p. 146–156, 2012.

HU, X.; NEILL, S. J.; TANG, Z.; CAI, G. J. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology*, v. 137, p. 663-670, 2005.

HU, K.; HU, L.; LI, Y.; ZHANG, F.; ZHANG, H. Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. *Plant Growth Regulation*, v. 57, p. 173-183, 2007.

HU, T.; LI, H-Y.; ZHANG, X-Z.; LUO, H-J.; FU, J-M. Toxic effect of NaCl on ion metabolism, antioxidative enzymes and gene expression of perennial ryegrass. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 74, p. 2050-2056, 2011.

HUA, Z.; WEN-BIAO, S.; LUNG-LAI, X. Effects of NO on the germination of wheat seeds and its ROS metabolisms under osmotic stress. *Acta Botanica Sinica*, v. 45, p. 901-905, 2003.

INNOCENTI, G.; PUCCIARIELLO, C.; LE GLEUHER, M.; HOPKINS, J.; STEFANO, M.; DELLEDONNE, M.; PUPPO, A.; BAUDOUIN, E.; FREDO, P. Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots, *Planta*, v. 225, p. 1597-1602, 2007.

JALEEL, C.A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANAVANNAN, P.; INES, J.; AL-JUBURI, H.J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses:

physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 427-436, 2009.

JAMES, R. A.; MUNNS, R.; CAEMMERER, S. V.; TREJO, C.; MILLER, C.; CONDON, T. Photosynthetic capacity is related to the cellular and subcellular partitioning of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in salt-affected barley and durum wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 2185-2197, 2006.

JONGSCHAAP, R. E. E.; CORRE, W. J; BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG W.A. **Claims and facts on jatropha curcas**. Plant Research International B.V., Wageningen. Stichting Het Groene Woudt, Laren, p. 1-42, 2007.

JOSEPH, B.; JINI, D. Insights into the role of antioxidative enzymes for salt tolerance in plants. **International Journal of Botany**, v. 6, p. 456–464, 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.

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

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J. C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, p. 709, 2011.

KHAN, M. N.; SIDDIQUI, M. H.; MOHAMMAD, F.; NAEEM, M. Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. **Nitric oxide**, v. 27, p. 210-218, 2012.

KHEIRA, A. A. A., ATTA, N. M. M. Response of *Jatropha curcas* L. to water deficits: yield, water use efficiency and oilseed characteristics. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 1343-1350, 2009.

KOPYRA, M.; GWÓŹDŹ, E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 1011-1017, 2003.

KRESLAVSKI, V. D.; LOS, D. A.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; KUZNETSOV, V. V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 59, p. 141-154, 2012.

KSOURI, R.; MEGDICHE, W.; DEBEZ, A.; FALLEH, H.; GRIGNON, C.; ABDELLY, C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 244–249, 2007.

KATWALL, R. P. S.; SONI, P. L. Biofuels: an opportunity for socioeconomic development and cleaner environment. **Indian Forest**, v. 129, p. 939-949, 2003.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p.1-10, 2008.

KUMAR, N.; PAMIDIMARR, S. D. V. N.; KAUR, M.; BORICHA, G.; REDDY, M. P. Effects of NaCl on growth, ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus cultures of *Jatropha curcas*. **Biology**, v. 63, p. 378-382, 2008.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983. 174 p. LAW, M.Y.; CHARLES, S.A.; HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of peroxide hydrogen and paraquat. **Biochemical Journal**, v. 210, p. 899-903, 1983.

LASPINA, N. V.; GROPPA, M. D. TOMARO, M. L.; BENAVIDES, M. P. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Science**, v. 169, p. 323-330, 2005.

LÄUCHLI, A.; GRATTAN, S. R. Plant growth and development under salinity stress. In: Jenks, M. A.; Hasegawa, P. M.; Jain, S. M. (eds.). **Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops**. Dordrecht: Springer, 2007. p.1- 32.

LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; MENDONÇA, S.; ALBRECHT, J. C.; ROSADO, T. B.; MARANA, J. C. RIBEIRO, J. A. A. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão-manso: Resultados do 1º ano de avaliação. **Comunicado Técnico Embrapa Agroenergia**, v. 3, p. 1-8, 2010.

- LAVIOLA, B. G.; OLIVEIRA, A. M. C.; BHERING, L. L.; ALVES, A. A.; ROCHA, R. B.; GOMES, B. E. L.; CRUZ, C. D. Estimates of repeatability coefficients and selection gains in *Jatropha* indicate that higher cumulative genetic gains can be obtained by relaxing the degree of certainty in predicting the best families. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 70-76, 2013.
- LAW, M.Y.; CHARLES, S.A.; HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of peroxide hydrogen and paraquat. *Biochemical Journal*, v. 210, p. 899-903, 1983.
- LEE, D. H.; KIM, Y. S.; LEE, C. B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). **Jornal of Plant Physiology**, v. 745, p. 737-745, 2001.
- LIN, J.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Antitumor Effects of curcumin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, p. 241-246, 2003.
- LIN, Y.; LIU, Z.; SHI, Q.; WANG, X.; WEI, M.; YANG, F. Exogenous nitric oxide (NO) increased antioxidant capacity of cucumber hypocotyl and radicle under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 142, p. 118-127, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOPES, L. S.; GALLAO, M. I.; BERTINI, C. H. C. M. Mobilisation of reserves during germination of *Jatropha* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 371-378, 2013.
- LOPES, L. S. **Condicionamento fisiológico de sementes de mamona como meio de atenuar os efeitos do estresse salino na germinação e estabelecimento da plântula**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em fitotecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- MACIEL, F. M.; LABERTY, M. A.; OLIVEIRA, N. D.; FELIX, S. P.; SOARES, A. M. S.; VERÍSSIMO, M. A.; MACHADO, O. L. T. A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seeds and assessment of its allergenic properties. **Peptides**, v. 30, p. 2103-2107, 2009.
- MAES, W. H.; ACHTEN, W. M. J.; REUBENS, B.; RAES, D.; SAMSON, R.; MUYS, B. Plant water relationships and growth strategies of *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. **Journal of Arid Environments**, v. 73, p. 877-884, 2009.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.1, p.176-177, 1962.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, A. S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.

MARQUES, E. C. **Aclimação de plantas de milho à salinidade mediada pelo pré-tratamento com nitroprussiato de sódio**. 2013. 99f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia molecular), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MARQUES, E. C.; FREITAS, V. S.; BEZERRA, M. A.; TARQUÍNIO, J. Efeitos do estresse salino na germinação, emergência e estabelecimento da plântula de cajueiro anão precoce. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 993-999, 2011.

MARQUES, E. C.; FREITAS, P. A. F.; ALENCAR, N. L. M.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Increased Na⁺ and Cl⁻ accumulation induced by NaCl salinity inhibits cotyledonary reserve mobilization and alters the source-sink relationship in establishing dwarf cashew seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v 35, p. 2171-2182, 2013.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, vol 20 (15), p. 2471-2472, 2004.

MEDEIROS, C. D.; NETO, J. R. F.; OLIVEIRA, M. T.; RIVAS, R.; PANDOLFI, V.; KIDO, E. A.; BALDANI, J. I.; SANTOS, M. G. Photosynthesis, antioxidante activities and transcriptional responses in two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, p. 447-459, 2014.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-manso. **Comunicado Técnico Embrapa Agroenergia**, v. 1, p. 1-7, 2009.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; BREUSEGEM, F. V.; NOCTOR G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models, **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 4197-4220, 2010.

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.

MISRA, A. N.; MISRA, M.; SINGH, R. Nitric oxide ameliorates stress responses in plants. **Plant Soil Environment**, v. 57, p. 95-100, 2011.

- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in plant science**, v. 9, p. 490-498, 2004.
- MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual review of plant biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.
- MØLLER, I. M.; SWEETLOVE, L. J. ROS signalling--specificity is required. **Trends in plant science**, v. 15, p. 370-4, 2010.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell Environment**, v. 28, p. 239-250, 2002.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mecanisms of Salinity Tolerance. **Annual Reviews Plant Biology**. v. 59, p. 651-681, 2008.
- NABATI J, KAFI M, NEZAMI A, MOGHADDAM PR, MASOUMI A, MEHRJERDI MZ. Effect of salinity on biomass production and activities of some key enzymatic antioxidants in kochia (*Kochia scoparia*). **Pak Journal Botany**, v. 43, p. 539–548, 2011.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.
- NASRABADI, H. T.; DEHGHAN, G. DAEIHASSANI, B.; MOVAFEGI, A.; SAMADI, A. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv.) cultivars. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 751-763, 2011.
- 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.
- OZTETIK, E. A tale of plant glutathione S-transferases: since 1970. **Botanical Review**, v. 74, p. 419-437, 2008.
- PALAVAN-UNSAL, N.; ARISAN, D. Nitric Oxide Signalling In Plants. **The Botanical Review**, v. 75, p. 203–229, 2009.

PANG, C.H.; WANG, B. S. Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate-glutathione cycle and stress tolerance in plants, in: ANJUM, N. A.; UMAR, S.; CHAN, M. T. (Eds.), **Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants**. Springer, 2010, p. 91-113.

PARAWIRA, W. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. **Scientific Research and Essays**, v. 5, p. 1796-1808, 2010.

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.

PEREIRA, B. L. C.; LIMA E BORGES, E. E.; OLIVEIRA, A. C.; LEITE, H. G.; GONÇALVES, J. F. C. Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigor. **Scientia Florestalis**, v. 38, p. 629-636, 2010.

POTTERS, G. **The role of ascorbate in the regulation of cell cycle and cellular redox status in a *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2 cell culture**. Tese (Doutorado). 2002. 164 p., Departement Biologie, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Antwerpen (Antuérpia, Bélgica), 2002.

POTTERS, G.; HOREMANS, N.; JANSEN, M. A K. The cellular redox state in plant stress biology- a charging concept. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, p. 292-300, 2010.

PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. (Org.). **Manejo da salinidade na agricultura irrigada: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 143-160.

QIAO, W.; FAN, L-M. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. **Journal of integrative plant biology**, v. 50, p. 1238-1246, 2008.

QUINTERO, J. M.; FOURNIER, J. M.; BENLLOCH, M. Na⁺ accumulation in shoot is related to water transport in K⁺ -starved sunflower plants but not in plants with a normal K⁺ status. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.60-67, 2007.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology**, v. 6, p. 507-533, 2012.

REJILI, M.; VADEL, A. M.; GUETET, A.; NEFFATTI, M. Effect on the growth and the ionic balance K⁺/Na⁺ of two populations of *Lotus creticus* (L.) (Papilionaceae). **South African Journal of Botany**, v.73, p.623-631, 2007.

ROCHA, A. J.; SOARES, E. L.; COSTA, J. H.; COSTA, W. L. G.; Soares, A. A.; NOGUEIRA, F. C. S.; DOMONT, G. B. Differential expression of cysteine peptidase genes in the inner integument and endosperm of developing seeds of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Plant Science**, v. 213, p. 30-37, 2013.

RUAN, H.; SHEN, W.; YE, M.; XU, L. Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Chinese Science Bulletin**, v. 47, p. 677–681, 2002.

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, 2012.

SANG, J.; JIANG, M. LIN, F. XU, S. ZHANG, A.; TAN, M. Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. **Journal of integrative plant biology**, v. 50, p. 231-243, 2008.

SANTOS, M. P. **O óxido nítrico modula os sistemas primários de transporte de prótons e as enzimas antioxidantes durante o estresse salino em plantas mutantes e não mutantes em ácido abscísico**. 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, 2009.

SARAIVA, K. D. C. **Caracterização, análise filogenética e perfil de expressão da família multigenica do fator de alongação α -1 (EF1 α) de soja (*Glycine max* L. Merr.): Detecção de genes normalizadores para qPCR**. 2013. 128 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia molecular), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SARATH, G.; BETHKE, P. C.; JONES, R.; BAIRD, L. M.; HOU, G.; MITCHELL, R. B. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. **Planta**, v. 223, p. 1154-1164, 2006.

SEKMEN, A. H.; TURKAN, I.; TAKIO, S. Differential responses of antioxidative and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritime* and salt-sensitive *Plantago media*. **Physiologia Plantarum**, v. 131, p.399-411, 2007.

SHALATA, A.; MITTOVA, V.; VOLOKITA, M.; GUY, M.; TAL, M. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 487-494, 2001.

- SHI, Q.; DING, F.; WANG, X.; WEI, M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. **Plant physiology and biochemistry**, v. 45, p. 542- 550, 2007.
- SHI, H.; LEE, B. H.; WU, S. J.; ZHU, J. K. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**, v. 21, p.81–85, 2003.
- SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M.H.; BASALAH, M.O. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. **Protoplasma**, v. 248, p. 447-455, 2011.
- SIDDIQUI, M. H.; MOHAMMAD, F.; KHAN, M. N.; NAEEM, M.; KHAN, M. M. A. Differential response of salt-sensitive and salt-tolerant *Brassica juncea* genotypes to N application: enhancement of N- metabolism and anti-oxidative properties in the salt-tolerant type. **Plant Stress**, v. 3, p. 55–63, 2009.
- SILVA, E. N.; SILVEIRA, J. A. G.; FERNANDES, C. R. R.; LIMA, C. S.; VIÉGAS, R. A. Contribution of organic and inorganic solutes to osmotic adjustment of physic nut (*Jatropha curcas*) under salinity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 437-445, 2009.
- SILVA, T. **Ação do óxido nítrico sobre o estresse de alumínio na germinação de arroz (*Oriza sativa* L.): Alterações fisiológicas e bioquímicas**. 2007. 56f. Dissertação [Mestrado Ciências Biológicas (Botânica)], Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- SILVA, E.N., VIEIRA, S.A., RIBEIRO, R.V., PONTE, L.F.A., FERREIRA-SILVA, S.L., SILVEIRA, J.A.G. Contrasting physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat. *J. Plant Growth Regulation*. v. 32, p. 159–169, 2013.
- SOLTANI, A.; GHOLIPOOR, M.; ZEINALI, E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, p. 195-200, 2006.
- SONG, L.; DING, W.; ZHAO, M.; SUN, B. ZHANG, L. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Science**, v. 171, p. 449-458, 2006.
- SOUZA, A. D. V.; FÁVARO, S. P.; ÍTAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de Pinhão manso, Nabo-forrageiro e Crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1328-1335, 2009.

SUNG, C.H.; HONG, J.H. Sodium nitroprusside mediates seedling development and attenuation of oxidative stress in Chinese cabbage. **Plant Biotechnology Reports**, v. 4, p. 243-251, 2010.

SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, p. 259–70, 2012.

TAMAOKI, M.; MATSUYAMA, T.; NAKAJIMA, N.; AONO, M.; KUBO, A.; SAJI, H. A method for diagnosis of plant environmental stresses by gene expression profiling using a cDNA macroarray. **Environmental Pollution**, v. 131, p.137-145, 2004.

TAPANES, N. C. O.; ARANDA, D. A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ANTUNES, O. A. C. Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. **Fuel**, v. 87, p. 2286-2295, 2008.

TEIXEIRA, F. K. **Identificação e caracterização dos genes que codificam as isoformas de ascorbato peroxidase em arroz (*Oryza sativa* L.)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

TRIVEDI, D.; GILL, S. S.; YADAV, S.; TUTEJA, N. Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from rice and Arabidopsis. **Plant Signaling and Behavior**, v. 8, p. 0-1, 2013.

TONG, L.; SHU-MING, P.; WU-YUAN, D.; DAN-WEI, M.; YING, X.; MENG, X.; FANG, C. Characterization of a new stearyl-acyl carrier protein desaturase gene from *Jatropha curcas*. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 657–662, 2006.

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.

VANDESOMPELE, J.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-Step sybr green real-time pcr. **Analytical Biochemistry**, v. 303, p. 95-98, 2002.

VOLKOV, V.; AMTMANN, A. *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion-channel features supporting K⁺/Na⁺ homeostasis under salinity stress. **The Plant Journal**, v.48, p.342-353, 2006.

VOIGT, E. L.; ALMEIDA, T. A.; CHAGAS, R. M.; PONTE, L. F. A.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 80-89, 2009.

VRANOVA, E. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1227-1236, 2002.

WANG, Q.; LIANG, X.; DONG, Y.; XU, L.; ZHANG, X.; HOU, J.; FAN, Z. Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity, element contents and antioxidative system in perennial ryegrass. **Plant Growth Regulation**, v. 69, p. 11-20, 2013.

WANG, S. H.; YANG, Z. M.; LU, B.; LI, S. Q.; LU, Y. P. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, v. 45, p. 203–212, 2004.

WANG, S. M.; ZHANG, J. L.; LIU, X. S.; LI, Z.; WU, G. Q.; CAI, J. Y.; FLOWERS, T. J. WANG, S. M. *Puccinellia tenuiflora* maintains a low Na⁺ level under salinity by limiting unidirectional Na⁺ influx resulting in a high selectivity for K⁺ over Na⁺. **Plant, Cell and Environment**, v.32, p.486-496. 2009.

WU, C. H.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant defense in adventitious roots of *Echinacea purpurea*. **Journal Plant Biology**, v. 50, p. 636–643, 2007.

WU, X.X.; DING, D.H.; CHEN, J.L.; ZHANG, H.J.; ZHU, W.M. Attenuation of salt-induced changes in photosynthesis by exogenous nitric oxide in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 7837-7846, 2011.

XU, Y.; SUN, X.; JIN, J; ZHOU, H. Protective effect of nitric oxide on light-induced oxidative damage in leaves of tall fescue. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 512-518, 2010.

YAMASAKI, H.; SHIMOJI, H.; OHSHIRO, Y.; SAKIHAMA, Y. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. **Nitric Oxide**, v. 5, 261–270, 2001.

ZHAO, L.; ZHANG, F.; GUO, J.; YANG, Y.; LI, B.; ZHANG, L. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant physiology**, v. 2004, p. 849-857, 2004.

ZHAO, X. X.; HUANG, L. K.; ZHANG, X. Q.; LI, Z.; PENG, Y. Effects of heat acclimation on photosynthesis, antioxidant enzyme activities, and gene expression in Orchardgrass under heat stress. **Molecules**, v. 19, p. 13564-13576, 2014.

ZERLIN, J. K. **Influência do óxido nítrico nos processos de embebição e mobilização de reservas durante a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e *Hymenaea courbaril* L.** 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em biodiversidade vegetal e meio ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.

ZHANG, Y.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; WEI, Q.; ZHANG, W. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. **Planta**, v. 224, p. 545-555, 2006.

ZHENG, C.; JIANG, D.; LIU, F.; DAI, T.; LIU, W.; JING Q.; CAO, W. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 222-227, 2009.

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

ZOTTINI, M.; FORMENTIN, E.; SCATTOLIN, M.; CARIMI, F.; SCHIAVO, F. L.; TERZI, M. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. **FEBS Letters**, v. 515, p. 75-78, 2002.