

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO
ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE MILHO

ANDRÉ DIAS DE AZEVEDO NETO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular

Fortaleza - CE

2005

N.Cham. T 574.192 A988a

Autor: Azevedo Neto, André

Título: Aspectos fisiológicos e bioquími



013839082

Ac. 70040

BCT

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

ANDRÉ DIAS DE AZEVEDO NETO

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO
ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE MILHO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

FORTALEZA - CE

2005

ANDRÉ DIAS DE AZEVEDO NETO

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO
ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE MILHO**

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

**ORIENTADOR:
ENÉAS GOMES FILHO**

FORTALEZA - CE

2005

R 1383 9082 (EXEMPLAR CATIVO)

A 70040

T
574.192
A988a

A988a

Azevedo Neto, André Dias de

Aspectos fisiológicos e bioquímicos do estresse salino em plantas de milho/ André Dias de Azevedo Neto.- Fortaleza:2005. 149f.: il.

Tese (Doutorado) em Bioquímica – Universidade Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

1.Milho 2.Salinidade 3.Estresse oxidativo 4.Ajustamento osmótico I.Título

C.D.D. 574.192

C.D.U. 577.1

ANDRÉ DIAS DE AZEVEDO NETO

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO
ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE MILHO**

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

TESE APROVADA EM: 22 / fevereiro / 2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

Prof. Dr. José Tarquínio Prisco

Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho

Profª. Dra. Rejane J. Mansur C. Nogueira

Dr. Marlos Alves Bezerra

FORTALEZA - CE

2005

*Ao meu pai Athos (minha eterna
saudade), à minha mãe Jacyra,
à minha mulher Marli e aos
meus filhos André e Stéphanie,*

DEDICO

“Eu peço que esta obra seja lida com indulgência e que os erros inevitáveis em matéria tão difícil sejam menos assunto de recriminação do que oportunidade para novas tentativas e pesquisas mais felizes”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Aos professores Enéas Gomes Filho e José Tarquinio Prisco pela confiança depositada, orientação, apoio, incentivo e sobretudo pela amizade;

Aos demais membros da banca examinadora, professores Joaquim Enéas Filho e Rejane J. Mansur Custódio Nogueira e Dr. Marlos Alves Bezerra, pelas sugestões apresentadas;

À Claudivan, Vieira, Valderez, Paulo Henrique, Lorena, Carlos Eduardo, Jand-Venes, Franklin, Elton, Alexcyane, Nara, Raquel, Valdinéia, Aldo, Wagner, Fabrício e Gislainy e demais alunos e professores do Departamento de Bioquímica da UFC, pela amizade, convívio e companheirismo;

Ao amigo Petrônio, pela colaboração nas análises de fracionamento de aminoácidos;

À todos os colegas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial à professora Rejane Mansur, a amiga Elizamar e meu compadre Emanuel, pela amizade e incentivo constantes;

Aos meus pais, Athos (*in memoriam*) e Jacyra, que ao longo da vida só me deram lições de honestidade, trabalho e perseverança;

À minha mulher Marli pela dedicação, compreensão e apoio constantes;

Aos meus filhos André e Stéphanie, que foram a principal fonte de estímulo para que eu realizasse o doutorado, além das minhas desculpas pelas inúmeras horas ausentes;

Aos meus tios e tias, pela total confiança que sempre depositaram em mim;

À CAPES pela concessão da bolsa, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro indispensável para a realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	07
RESUMO	10
ABSTRACT	12
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	14
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	17
CAPÍTULO 1	20
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Origem e Importância Econômica do Milho	21
1.2. Aspectos Gerais da Salinização dos Solos	28
1.3. Efeitos da Salinidade Sobre as Plantas	29
1.3.1. Salinidade e crescimento	30
1.3.2. Salinidade e ajustamento osmótico	32
1.3.3. Salinidade e íons inorgânicos	34
1.3.4. Salinidade e solutos orgânicos	35
1.3.5. Salinidade e estresse oxidativo	37
1.4. Objetivos	41
1.5. Referências Bibliográficas	42
CAPÍTULO 2 (trabalho publicado)	49
Abstract	50
Resumo	51
1. INTRODUCTION	52
2. MATERIALS AND METHODS	53
2.1. Growth condition and treatments	53
2.2. Growth analysis	54
2.3. Transpiration, stomatal conductance, leaf temperature and leaf water potential ...	54
2.4. Na ⁺ , K ⁺ , amino acids and soluble carbohydrates contents	55
2.5. Experimental design and statistical analysis	55
3. RESULTS	55

3.1. Growth analysis	55
3.2. Transpiration and leaf water potential	57
3.3. Na ⁺ , K ⁺ , amino acids and soluble carbohydrate contents	57
3.4. Plant growth, solute accumulation and predawn leaf water potential relationships	60
4. DISCUSSION	60
5. REFERENCES	65
CAPÍTULO 3	68
1. INTRODUÇÃO	69
2. MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1. Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos.....	70
2.2. Preparo do extrato	71
2.3. Análise dos teores de carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e proteínas solúveis	72
2.4. Derivatização dos aminoácidos	72
2.5. Análise de aminoácidos livres	72
2.6. Análise estatística	73
3. RESULTADOS	73
3.1. Carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e proteínas solúveis	73
3.2. Aminoácidos livres	75
4. DISCUSSÃO	82
5. REFERÊNCIAS	90
CAPÍTULO 4 (trabalho publicado)	95
Abstract	96
1. INTRODUCTION	97
2. MATERIALS AND METHODS	99
2.1. Plant material, growth and treatment conditions	99
2.2. Extract preparation	100
2.3. Enzyme assays	100

2.4. Lipid peroxidation	102
2.5. Statistical analysis	102
3. RESULTS	102
3.1. Enzyme activity	102
3.2. Lipid peroxidation	109
4. DISCUSSION	109
5. REFERENCES	114
CAPÍTULO 5 (trabalho publicado)	119
Summary	120
1. INTRODUCTION	121
2. MATERIALS AND METHODS	123
2.1. Plant material, growth and treatment conditions	123
2.2. Extract preparation	124
2.3. Enzyme assays	124
2.4. Lipid peroxidation	126
3. RESULTS	126
3.1. Plant growth	126
3.2. Enzyme activity	127
3.3. Lipid peroxidation	131
4. DISCUSSION	131
5. REFERENCES	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	142
REFERÊNCIAS	148

AZEVEDO NETO, A. D. ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE MILHO.

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas as respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas de milho ao estresse salino. Foram realizados três experimentos em casa de vegetação, cultivando-se as plantas em solução nutritiva com ou sem 100 mM de NaCl. O primeiro experimento objetivou estudar os efeitos da salinidade sobre o crescimento, trocas gasosas e acúmulo de solutos em oito genótipos de milho, bem como selecionar genótipos com tolerâncias diferenciadas ao estresse salino. O estresse salino reduziu o crescimento das plantas de todos os genótipos, sendo o BR5033 e o BR5011 caracterizados como tolerante e sensível ao estresse salino, respectivamente. A resposta estomática do genótipo tolerante não foi influenciada pela salinidade. Entre os parâmetros estudados, a relação de matéria seca parte aérea/raiz e os teores de sódio e de solutos orgânicos nas folhas não mostraram relação com a tolerância à salinidade. Em contraste, os teores de sódio e de solutos orgânicos nas raízes parecem desempenhar um importante papel na aclimação dos genótipos estudados ao estresse salino. O segundo experimento estudou o acúmulo de solutos orgânicos e de aminoácidos livres, bem como a peroxidação dos lipídios e a atividade de enzimas antioxidativas, ao longo do tempo, em folhas e raízes dos genótipos de milho que apresentaram tolerâncias diferenciadas ao estresse salino (BR5033 e BR5011). Os teores de N-aminossolúveis e de proteínas solúveis nas folhas e raízes dos dois genótipos permaneceram constantes ou aumentaram com o estresse. Os teores de carboidratos solúveis também permaneceram constantes no BR5033, mas diminuíram em ambas as partes da planta do BR5011. O teor da maioria dos aminoácidos livres aumentou com o estresse, nas folhas e raízes dos dois genótipos. Entretanto, prolina, treonina, arginina, serina, aspartato e glicina foram os de maior participação relativa no total de aminoácidos livres. As atividades da SOD, APX, GPX e GR nas folhas aumentaram com o estresse, sendo estes aumentos mais pronunciados no BR5033 do que no BR5011. A atividade da CAT não foi afetada pelo estresse salino nas folhas do BR5033 mas foi reduzida no BR5011. A salinidade não alterou as atividades da APX, GPX e GR nas raízes do BR5033 mas reduziu as atividades de todas as enzimas estudadas nas raízes do BR5011. Os resultados mostraram que CAT e GPX foram as enzimas com maior atividade removedora do H_2O_2 e que as atividades da CAT, APX e GPX coordenadas com a atividade da SOD parecem desempenhar um papel protetor essencial nos processos de remoção do H_2O_2 . A salinidade só aumentou a peroxidação dos lipídios nas

folhas do BR5011. Os resultados deste experimento indicaram que o estresse oxidativo pode desempenhar um importante papel em plantas de milho sob estresse salino e que a maior proteção das folhas e raízes do genótipo BR5033 contra os danos oxidativos induzidos pelo sal resultam, ao menos em parte, da manutenção e/ou aumento da atividade das enzimas antioxidativas. O terceiro experimento estudou o efeito do pré-tratamento com H_2O_2 no crescimento, na peroxidação dos lipídios e na atividade de enzimas antioxidativas, ao longo do tempo, em folhas e raízes do genótipo de milho sensível ao estresse salino. O pré-tratamento com H_2O_2 induziu um aumento da tolerância à exposição subsequente do estresse salino. Esta observação foi confirmada pelas medidas das matérias secas da parte aérea e das raízes e da área foliar. O estresse salino aumentou as atividades da APX, GPX e GR nas folhas das plantas não aclimatadas. Contudo, nas folhas das plantas aclimatadas as atividades de todas as enzimas antioxidativas aumentaram com a salinidade. Nas raízes, o estresse salino não provocou grandes alterações nas atividades enzimáticas, exceto por um aumento na atividade da CAT nas plantas aclimatadas e um decréscimo nas não aclimatadas, no final do período experimental. O estresse salino aumentou a peroxidação dos lipídios das folhas mas não afetou a das raízes. Os resultados sugerem que as diferenças nas atividades do sistema antioxidativo podem, ao menos em parte, explicar o aumento da tolerância à salinidade nas plantas aclimatadas e que o metabolismo do H_2O_2 está envolvido nos processos de aclimação do milho ao estresse salino.

Palavras-chave: Aclimação, crescimento, enzimas antioxidativas, estresse oxidativo, milho, osmorregulação, peroxidação dos lipídios, salinidade, trocas gasosas, *Zea mays*.

AZEVEDO NETO, A. D. **PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF SALT STRESS IN MAIZE PLANTS.**

ABSTRACT

In this paper, the physiological and biochemical responses to salt stress of maize plants were studied. Three experiments were performed in a greenhouse, and the plants were grown in nutrient solution with or without 100 mM NaCl added. The aim of first experiment was to evaluate the salt stress effects on growth, water relations, gas exchange, and solute accumulation of eight maize genotypes. Salt stress reduced plant growth of all genotypes but the genotypes BR5033 and BR5011 were characterized as the most salt-tolerant and salt-sensitive, respectively. Stomatal response of the salt-tolerant genotype was not affected by salinity. Among the studied parameters, shoot to root dry mass ratio, leaf sodium content and leaf soluble organic solute content showed no relation with salt tolerance. In contrast, sodium and soluble organic solutes accumulation in the roots as a result of salt stress appeared to play an important role in the acclimation to salt stress of the maize genotypes studied. The second experiment evaluated the time course of salt stress effects on organic solutes and free amino acids accumulation, as well as the lipid peroxidation and activity of antioxidative enzymes in leaves and roots of maize genotypes differing in salt tolerance (BR5033 and BR5011). In leaves and roots of the two genotypes, soluble amino-N and soluble protein contents were unchanged or increased with salt stress. Soluble carbohydrate contents also stayed constant in BR5033, but decreased in both leaves and roots of BR5011 plants. Salt stress increased most of free amino acids contents, in leaves and roots of two genotypes. However, proline, threonine, arginine, serine, aspartate, and glycine were the amino acids that more contributed for the osmotic potential reduction. In leaves of salt-stressed plants, SOD, APX, GPX and GR activities increased with time when compared to the controls. However the increase was more pronounced in the BR5033 than in the BR5011 genotype. Salt stress had no significant effect on CAT activity in leaves of BR5033, but it was reduced in the BR5011 genotype. APX, GPX and GR activities remained unchanged in salt-stressed roots of BR5033 genotype, but reduced the activity of all studied enzymes in roots of the BR5011 genotype. The data showed that CAT and GPX enzymes had the greatest H₂O₂ scavenger activity. Moreover, CAT, APX and GPX activities in conjunction with SOD activity seem to play an essential protective role in the H₂O₂ scavenging processes. Lipid peroxidation was enhanced only in salt-stressed leaves of the BR5011 genotype. These results indicate that oxidative stress may play an important role in salt-stressed maize plants and that the greater protection of BR5033 leaves and roots

from salt-induced oxidative damage results, at least in part, through the maintenance and/or increase of the activity of antioxidant enzymes. The third experiment evaluated the effects of H₂O₂ pre-treatment on plant growth, lipid peroxidation and activity of antioxidative enzymes in leaves and roots of a salt-sensitive maize genotype. H₂O₂ pre-treatment induced an increase of salt tolerance during subsequent exposure to salt stress. This observation was confirmed by shoot and root dry masses and leaf area measurements. In leaves of unacclimated plants, salt stress increased APX, GPX, and GR. However, in acclimated plants, salt stress increased the activities of all antioxidative enzymes. In roots, the salt stress did not result in striking changes in enzyme activities, except for an increase in CAT activity in acclimated and a decrease in unacclimated plants at the end of experimental period. Salt stress increased lipid peroxidation in leaves, but had almost no effect in roots. The results suggest that differences in the antioxidative enzyme activities may, at least in part, explain the increased tolerance of acclimated plants to salt stress, and that H₂O₂ metabolism is involved as signal in the processes of maize salt acclimation.

Keywords: Acclimation, antioxidative enzymes, gas exchange, growth, lipid peroxidation, milho, osmoregulation, oxidative stress, salinity, *Zea mays*.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1.1	Estimativa do consumo de milho no Brasil por segmento, em percentagem do consumo total (safras de 1998/99 a 2003/04).....	22
Tabela 1.2	Produção e consumo mundial de milho em milhões de toneladas (safras 95/96 a 03/04)	23
Tabela 1.3	Série histórica da produção, área plantada, produtividade e consumo de milho no Brasil (safras de 1990/91 a 2003/04)	24
Tabela 1.4	Produção de milho, área plantada e número de informantes, segundo tamanho da propriedade	24
Tabela 1.5	Séries históricas de produção, consumo e produtividade do milho nos Estados da Região Nordeste (safras de 1990/91 a 2003/04)	26
Figure 2.1	Shoot (SDM) and root (RDM) dry masses, shoot to root dry mass ratio (SDM/RDM), leaf area (LA), relative growth rate (RGR), and net assimilation rate (NAR) of eight maize genotypes grown under control and salt stress conditions	56
Table 2.1	Leaf temperature (T_l), stomatal conductance (g_s), transpiration (E) and predawn leaf water potential (Ψ_w) of eight maize genotypes grown under control and salt stress conditions	58
Figure 2.2	Sodium, potassium, soluble amino acids and soluble carbohydrates in leaves and roots of eight maize genotypes grown under control and salt stress conditions	59
Figure 2.3	Correlation between soluble amino acids, and soluble carbohydrates in roots <i>versus</i> relative growth rate (RGR) and net assimilation rate (NAR) of eight maize genotypes grown in nutrient solution with added 100	

mmol.L ⁻¹ of NaCl	61
Figura 3.1 Conteúdo, em porcentagem do controle, de carboidratos solúveis, compostos N-aminossolúveis e proteínas solúveis nas folhas e raízes de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle e de estresse salino	74
Figura 3.2 Teores de alanina, serina, glicina, glutamato e cisteína nas folhas de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle e de estresse salino	76
Figura 3.3 Teores de arginina, histidina, prolina, isoleucina e leucina nas folhas de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle e de estresse salino	77
Figura 3.4 Teores de aspartato, tirosina, treonina, valina e metionina nas folhas de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle e de estresse salino	78
Figura 3.5 Teores de alanina, serina, glicina, glutamato e cisteína nas raízes de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle e de estresse salino	79
Figura 3.6 Teores de arginina, histidina, prolina, isoleucina e leucina nas raízes de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle e de estresse salino	80
Figura 3.7 Teores de aspartato, tirosina, treonina, valina e metionina nas raízes de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle e de estresse salino	81
Figure 4.1 Time course of total SOD activity in leaves and roots of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under	

	control and salt stress conditions	103
Figure 4.2	Time course of total CAT activity in leaves and roots of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control and salt stress conditions	105
Figure 4.3	Time course of total APX activity in leaves and roots of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control and salt stress conditions	106
Figure 4.4	Time course of total GPX activity in leaves and roots of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control and salt stress conditions	107
Figure 4.5	Time course of total GR activity in leaves and roots of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control and salt stress conditions	108
Figure 4.6	Time course of malondialdehyde content in leaves and roots of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control and salt stress conditions	110
Figure 5.1	Time course of changes in shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM), and leaf area (LA) of maize plants	128
Figure 5.2	Time course of total SOD activity in leaves and roots of maize plants	129
Figure 5.3	Time course of total CAT, APX, GPX, and GR activities in leaves of maize plants	129
Figure 5.4	Time course of total CAT, APX, GPX, and GR activities in roots of maize plants	132
Figure 5.5	Time course of changes in total malondialdehyde content in leaves and roots of maize plants	132

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Aclimatação – aumento da capacidade das plantas sobreviverem a condições adversas, em decorrência de modificações fisiológicas temporárias provocadas por mudanças ambientais. Embora a aclimatação possa envolver a expressão gênica, ela é uma resposta homeostática e não é transmitida de uma geração para outra. Consequentemente, *aclimatação é uma alteração fisiológica*.

Adaptação – aumento da capacidade das plantas sobreviverem a condições adversas, em decorrência de alterações morfo-fisiológicas definitivas provocadas pela seleção evolucionária (natural ou artificial) de genes. Como a adaptação envolve a alteração gênica, ela é transmitida de uma geração para outra. Consequentemente, *adaptação é uma evolução*.

Antioxidante – em geral pode ser definido como qualquer substância que, mesmo presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, retarda significativamente ou evita sua oxidação.

Condutividade elétrica – capacidade de conduzir eletricidade; grandeza (expressa em dS.m^{-1}) que se correlaciona diretamente com a quantidade de íons dissolvidos em água e presentes no extrato de saturação do solo, nas águas de irrigação ou nas soluções nutritivas.

Espécies reativas de oxigênio – termo coletivo aplicado a diversas espécies químicas envolvidas no estresse oxidativo, podendo ser radicais livres (como o íon superóxido) ou não (como o peróxido de hidrogênio).

Estresse – diz-se que uma planta sofreu um estresse quando qualquer fator ambiental provoca alterações no seu metabolismo, induzindo, em consequência, mudanças no seu crescimento e desenvolvimento.

Estresse oxidativo – é um distúrbio no estado de equilíbrio da relação entre oxidantes e antioxidantes em células intactas e resulta das reações metabólicas que reduzem parcialmente o oxigênio molecular.

Peroxidação lipídica – termo que trata da oxidação enzimática dos lipídios poli-insaturados presentes nas membranas biológicas. O termo oxidação dos lipídios é mais utilizado quando se trata da oxidação não enzimática.

Radical livre – termo que define qualquer espécie química de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados. Isto as torna altamente instáveis e reativas que, para atingir sua estabilidade tendem a oxidar, rapidamente, as biomoléculas.

Resistência – o conceito de resistência, estabelecido por Levitt (1972), refere-se a qualquer tipo de mecanismo desenvolvido pelas plantas que garantam a sua sobrevivência em condições ambientais adversas. Estes mecanismos podem ser agrupados em duas categorias gerais: (a) **escape ou fuga**, que permite à planta completar seu ciclo vital sem ter sido exposta ao agente estressor e (b) **tolerância**, que permite à planta completar seu ciclo vital, mesmo sendo exposta ao agente estressor. Apesar desta terminologia não ter sido usada neste trabalho, respeitou-se o seu uso nas citações feitas por outros autores.

Salinidade – quantidade de sais solúveis presentes na água do mar, nas águas de irrigação ou nos perfis dos solos, capazes de reduzir ou, até mesmo, impedir o crescimento, desenvolvimento e a produção das culturas.

APX – Peroxidase do ascorbato

CAT – Catalase

CE – Condutividade elétrica

DHAR – Redutase do desidroascorbato

E – Transpiration (transpiração)

GPX – Peroxidase do guaiacol

GR – Redutase da glutathione

g_s – Stomatal conductance (condutância estomática)

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

LA – Leaf area (área foliar)

MDA – Malondialdeído ou aldeído malônico

MDHAR – Redutase do monodesidroascorbato

NAR – Net assimilation rate (taxa de assimilação líquida)

NBT – Nitro blue tetrazolium chloride

O₂^{•-} – Radical livre superóxido

OH[•] – Radical livre hidroxila

PAR – Photosynthetic active radiation (radiação fotossinteticamente ativa)

PICT – Fenilisotiocianato

POX – Peroxidase

RDM – Root dry mass (massa seca das raízes)

RGR – Relative growth rate (taxa de crescimento relativo)

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SDM – Shoot dry mass (massa seca da parte aérea)

SDM/RDM – Shoot to root dry mass ratio (relação massa seca da parte aérea/raiz)

SOD – Dismutase do superóxido

T_l – Leaf temperature (temperatura foliar)

Ψ_w – Predawn leaf water potential (potencial hídrico antemanhã)

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origem e Importância Econômica do Milho

1.2. Aspectos Gerais da Salinização dos Solos

1.3. Aspectos Gerais da Salinidade Sobre as Plantas

1.3.1. Efeitos da salinidade sobre o crescimento

1.3.2. Ajustamento osmótico

1.3.3. Efeitos da salinidade sobre os íons inorgânicos

1.3.4. Efeitos da salinidade sobre os solutos orgânicos

1.3.5. Efeitos da salinidade sobre o estresse oxidativo

1.4. Objetivos

1.5. Referências Bibliográficas

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origem e Importância Econômica do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é, provavelmente, a mais importante planta comercial com origem nas Américas. Há indícios que esta espécie seja originária da região onde hoje se situa o México, e que foi domesticada num período entre 7.000 e 10.000 anos atrás (Paterniani, 1993). Logo depois do descobrimento da América, o milho foi levado para a Europa, onde era cultivado em jardins, até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. Passou, então, a ser plantado em escala comercial e espalhou-se desde a latitude de 58° norte (União Soviética) até 40° sul (Argentina) (Godoy, 2002). Como resultado da seleção, tanto artificial como natural, o homem civilizado herdou dos povos mais antigos cerca de 300 raças de milho, caracterizadas pelas mais diversas adaptações, tanto para as condições ambientais como para os vários usos do cereal. Acrescentando-se, ainda, a diversidade de variedades intra-raciais e a enorme quantidade de genes identificados, o milho é citado como a espécie botânica de maior diversidade genética na natureza (Paterniani, 1993).

A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Atualmente, estima-se que existam cerca de 600 produtos em que o milho participa como matéria prima. Na indústria, por exemplo, este cereal é empregado como matéria prima para a produção de amido, óleo, metanol, farinha, glicose, rações animais e na elaboração de formulações alimentícias (Almeida, 1993; Pinazza, 1993). Entretanto, o uso do milho em grão para a alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo. No Brasil, o percentual destinado a esse fim pode variar de 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e do ano considerado (Duarte, 2000). Maiores detalhes do consumo de milho por segmento da economia podem ser melhor visualizados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Estimativa do consumo de milho no Brasil por segmento, em percentagem do consumo total (safras de 1998/99 a 2003/04).

SEGMENTO	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04*
Avicultura	35,49	36,32	34,48	36,74	35,47	35,77
Suinocultura	21,75	23,66	21,97	22,63	19,47	19,59
Pecuária	7,51	7,64	7,09	7,20	4,39	4,87
Outros animais	4,19	4,26	3,91	3,91	3,56	3,50
Consumo industrial	11,76	11,36	10,36	10,36	9,55	9,42
Consumo humano	4,13	4,19	3,85	3,84	3,52	3,47
Perdas/sementes	2,43	2,41	2,55	2,31	3,82	3,16
Exportação	0,00	0,00	6,52	4,01	9,17	11,07
Outros	12,73	10,14	9,27	9,00	11,06	9,15

Fonte: Associação Brasileira das Indústrias do Milho (ABIMILHO), 2004; *Estimativa

A produção mundial de milho compete com a de trigo pelo título de grão mais produzido no mundo. Esse fato, relativamente recente, deve-se ao forte crescimento da demanda mundial. Na safra de 1995/96 o consumo mundial de milho estava na faixa de 533 milhões de toneladas/ano; já para a safra 2003/04, a FAO está prevendo o consumo de cerca de 642 milhões de toneladas, o que representa um incremento de 20% em oito anos (Tabela 1.2). O consumo mundial de milho vem sendo proporcionalmente maior do que a produção a partir da safra 2000/01. Este fato deve-se, em parte, à irregularidade nas últimas safras dos Estados Unidos, maior produtor mundial, respondendo por metade do milho anualmente produzido. Por outro lado, a alteração no hábito alimentar dos europeus e americanos que passaram a se alimentar de carne branca ocasionou elevação da produção mundial de frangos fazendo, conseqüentemente, aumentar a demanda por rações que têm o milho como principal matéria-prima (Tavares, 2004).

Tabela 1.2. Produção e consumo mundial de milho em milhões de toneladas (safras 1995/96 a 2003/04).

	1995/96	1996/97	1997/98	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04
Produção	517,1	591,8	584,7	605,7	606,9	586,4	599,3	603,4	607,1
Consumo	533,2	558,2	578,5	582,8	605,1	601,9	621,8	630,8	641,9

Fonte: FAO, 2004

Dentro da evolução mundial da produção de milho, o Brasil tem se destacado como terceiro maior produtor, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China (Duarte, 2000). Ao contrário do que é observado no cenário mundial, a produção de milho no Brasil vem crescendo mais do que o consumo interno (Tabela 1.3). Entretanto, apesar de estar entre os três maiores produtores, o Brasil não se destaca entre os países com maior nível de produtividade, considerando que a produtividade mundial média está em torno de 4.860 kg/ha (FAO, 2004). Embora a produtividade brasileira esteja abaixo deste valor, ela tem crescido sistematicamente, passando de 1.791 kg/ha, na safra 1990/91, para 3.291 kg/ha, na safra 2003/04, representando um incremento médio de 6,5% ao ano nos últimos 13 anos. Vale ressaltar que a cultura do milho no Brasil, ainda conta com grandes possibilidades de aumento de produção, via crescimento de produtividade.

Segundo dados do censo agropecuário do IBGE de 1996 (Tabela 1.4), os pequenos produtores (94,3%) são responsáveis por 30% da produção, usando 45,63% da área destinada ao cultivo desse cereal no país. Por outro lado, os grandes produtores (2,4%) produzem 60,08% do milho colhido no Brasil cultivando 43,91% da área.

Tabela 1.3. Série histórica da produção, área plantada, produtividade e consumo de milho no Brasil (safras de 1990/91 a 2003/04).

SAFRAS	Produção (mil toneladas)	Área (mil hectares)	Produtividade (kg/hectare)	Consumo (mil toneladas)
1990/91	24.096	13.451	1.791	25.288
1991/92	30.771	14.027	2.194	28.500
1992/93	29.208	12.436	2.349	30.775
1993/94	33.174	14.152	2.344	32.732
1994/95	37.442	14.282	2.622	35.514
1995/96	32.405	13.757	2.356	36.225
1996/97	35.716	13.799	2.588	35.912
1997/98	30.188	11.391	2.650	35.000
1998/99	32.393	12.513	2.589	35.300
1999/00	31.641	12.758	2.480	35.300
2000/01	42.290	12.973	3.260	36.235
2001/02	35.281	12.319	2.864	36.400
2002/03	47.411	13.226	3.585	38.400
2003/04	42.158	12.812	3.291	39.600

Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2004.

Tabela 1.4. Produção de milho, área plantada e número de informantes, segundo tamanho da propriedade.

Tamanho da Propriedade (ha)	Área plantada		Produção		Informantes	
	(1000 ha)	% do total	(1000 t)	% do total	(x 1000)	% do total
Menos de 10	4.842	45,6	7.654	30,0	2.395	94,3
10 a 20	1.110	10,5	2.531	9,9	84	3,3
20 a 100	1.951	18,4	5.544	21,7	51	2,0
Acima de 100	2.709	25,5	9.783	38,4	10	0,4
Total	10.612	100,0	25.512	100,0	2.540	100,0

Fonte: IBGE, Censo agropecuário de 1995/96

A Tabela 1.5 apresenta as séries históricas de produção, consumo e produtividade do milho por cada Estado da Região Nordeste. Observa-se que a Bahia, com mais de 1,7 milhão de toneladas, é o maior produtor de milho do Nordeste. Este Estado tem se constituído em nova fronteira para a produção de milho em escala comercial, principalmente, nas áreas de cerrado, onde essa cultura vem sendo impulsionada pela expansão da soja. Nos Estados do Ceará e Pernambuco, o aumento do consumo de milho foi impulsionado pelo grande crescimento da produção de aves. Nos outros Estados a produção de milho é marginal, sendo caracterizada por cultivos familiares para consumo no próprio estabelecimento (Helfand & Rezende, 1998). No contexto nacional, o Nordeste configura-se como a região mais deficitária do país no que diz respeito à relação produção/demanda, importando cerca de 10% da produção nacional de milho. Ceará, Pernambuco e Bahia são os maiores consumidores e juntos, são responsáveis por mais de 60% da importação anual de milho do Nordeste.

Ainda na Tabela 1.5, pode-se verificar que a produtividade nos Estados do Maranhão, Sergipe e Bahia, embora tenha aumentado sistematicamente nos últimos anos, ainda permanece muito abaixo da média nacional atual (acima de 3.000 kg/ha). Embora o baixo uso de tecnologia seja comumente citado como a causa principal da baixa produtividade do milho no Nordeste, aspectos culturais, sócio-econômicos e ambientais, subjacentes à baixa tecnologia, concorrem substancialmente para o baixo nível de produtividade nesta região, tais como:

- A quase totalidade do plantio de milho em condições de sequeiro é realizado em pequenas propriedades, com baixa qualificação de mão-de-obra, disponibilidade de tecnologia e elevado estado de pobreza.

Tabela 1.5. Séries históricas de produção, consumo e produtividade do milho nos Estados da Região Nordeste (safras de 1990/91 a 2003/04).

Série histórica de produção (em mil toneladas). Safras 1990/91 a 2003/04														
UF	90/91	91/92	92/93	93/94	94/95	95/96	96/97	97/98	98/99	99/00	00/01	01/02	02/03	03/04
MA	355	237	197	413	423	455	363	210	294	314	310	325	414	430
PI	257	77	60	441	405	437	177	61	236	231	145	84	287	152
CE	387	183	33	479	469	589	274	91	442	636	245	623	749	354
RN	71	35	1	88	83	84	47	7	20	59	8	70	71	58
PB	138	54	9	172	157	239	200	4	41	150	8	74	123	135
PE	232	34	5	256	254	292	208	7	35	140	43	79	82	112
AL	59	44	2	71	47	53	64	64	33	22	117	52	18	41
SE	70	32	3	69	85	111	94	94	118	96	99	48	133	173
BA	463	522	283	624	759	689	1.201	751	1.011	1.306	1.013	715	1.399	1.703
NE	2.031	1.219	593	2.613	2.680	2.948	2.628	1.289	2.229	2.954	1.988	2.068	3.278	3.160
Série histórica de consumo (em mil toneladas). Safras 1990/91 a 2003/04														
UF	90/91	91/92	92/93	93/94	94/95	95/96	96/97	97/98	98/99	99/00	00/01	01/02	02/03	03/04
MA	724	831	806	869	938	857	910	822	857	845	1.015	903	1.097	1.013
PI	362	402	393	417	442	412	432	399	412	408	472	429	502	471
CE	903	1.043	1.010	1.093	1.183	1.077	1.147	1.031	1.077	1.061	1.285	1.138	1.392	1.282
RN	147	173	167	183	200	180	193	171	180	177	219	191	240	219
PB	228	261	254	273	295	269	286	258	269	266	319	284	345	318
PE	633	773	740	824	913	807	877	761	807	791	1.015	868	1.123	1.012
AL	145	172	166	182	199	179	192	170	179	176	218	190	239	218
SE	136	149	146	154	162	152	159	148	152	151	172	158	182	172
BA	1.467	1.627	1.590	1.552	1.637	1.537	1.603	1.492	1.536	1.521	1.734	1.594	1.837	1.732
NE	4.745	5.432	5.271	5.547	5.969	5.471	5.798	5.251	5.470	5.395	6.449	5.755	6.956	6.436
Série histórica de produtividade (em kg/ha). Safras 1990/91 a 2003/04														
UF	90/91	91/92	92/93	93/94	94/95	95/96	96/97	97/98	98/99	99/00	00/01	01/02	02/03	03/04
MA	630	409	370	700	650	700	620	690	925	980	960	1.000	1.150	1.160
PI	790	200	150	950	880	993	406	237	850	817	520	299	1.016	510
CE	660	300	68	680	720	855	525	190	760	1.028	400	895	1.050	520
RN	500	245	34	660	610	593	370	102	249	606	96	671	650	470
PB	540	200	102	740	600	900	783	33	341	930	60	450	690	702
PE	600	107	60	704	700	819	620	66	143	466	160	280	288	410
AL	550	500	60	545	416	438	540	540	279	340	1.500	663	315	600
SE	870	530	150	889	926	1.111	916	916	1.350	1.100	1.100	478	1.200	1.200
BA	831	814	578	1.273	1.529	1.213	1.763	1.488	1.532	1.997	1.436	1.063	1.755	2.167
NE	750	435	287	849	891	946	921	699	1.029	1.294	865	869	1.272	1.220

Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2004.

- O milho tem sido caracterizado por muitos anos como uma cultura de subsistência, onde o grão é utilizado na alimentação humana e a palhada na alimentação animal. Consequentemente seu plantio ocorre em diversas épocas e locais, mesmo os considerados impróprios à cultura.
- As áreas efetivamente irrigáveis no Semi-árido do Nordeste não devem superar os 2.500.000 ha, devido às limitações existentes em termos de profundidade e de qualidades física e química dos solos e, principalmente, de quantidade e qualidade da água (Suassuna, 2002). Considerando-se que o Nordeste tem cerca de 155.000.000 ha e que 52% dessa área é semi-árida (Lira et al., 1982), conclui-se que apenas cerca de 3% do semi-árido do Nordeste são passíveis de irrigação.
- Do ponto de vista climático, a característica fundamental do semi-árido nordestino é o regime de chuvas marcado pela escassez, irregularidade, concentração e má distribuição das precipitações pluviométricas. Este fato reflete-se no alto índice de frustração de safras em condições de sequeiro (em cada 10 anos de cultivo, apenas dois obtêm sucesso). A solução para este problema depende, essencialmente, da adoção da agricultura irrigada.
- Considerando-se que o crescimento da avicultura tem impulsionado a demanda de milho no Nordeste e que a agricultura irrigada é condição indispensável para o aumento da produtividade no semi-árido, o governo criou incentivos para produção de milho sob irrigação. Infelizmente, devido a falta de experiência com este tipo de exploração agrícola, usou-se um manejo inadequado da água e do solo, resultando em um aumento da área salinizada. Portanto, a solução deste problema, tanto no ponto de vista agrônomo, como no sócio-econômico, configura-se como de grande importância para a produção agrícola nessa região.

Diante do exposto, a importância do milho não está apenas na produção de uma cultura anual, mas em todo o relacionamento que essa cultura tem na produção agropecuária, tanto no

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

1.2. Aspectos Gerais da Salinização dos Solos

O solo contém normalmente uma solução muito diluída de sais, os quais, ao serem absorvidos pelas raízes, irão promover a nutrição mineral das plantas. Os sais solúveis do solo consistem, em grande parte e em proporções variadas, dos cátions Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} e dos ânions Cl^- e SO_4^{2-} . O cátion K^+ e os ânions HCO_3^- , CO_3^{2-} e NO_3^- , geralmente são encontrados em baixas concentrações (Daker, 1988). O excesso destes íons reduz o potencial osmótico da solução do solo e aumenta a sua condutividade elétrica (CE), de forma que um solo é considerado salino quando a CE do seu extrato saturado é superior a $4,0 \text{ dS.m}^{-1}$. Adicionalmente, pode ocorrer o fenômeno de desestruturação do solo, o qual é decorrente da saturação do complexo de troca pelo Na^+ que, ao substituir os cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} , conduz à dispersão das argilas e torna a porosidade do solo quase nula (Richards, 1974).

A salinização dos solos pode ter diversas origens, sendo que entre os fatores naturais os que mais podem contribuir para o processo de salinização dos solos são o material de origem e o clima. No primeiro caso, a intemperização química dos minerais e rochas da crosta terrestre é a principal fonte responsável pela liberação e distribuição dos íons (Daker, 1988). Com relação ao clima, o balanço hídrico desfavorável para a lixiviação em profundidade e a conseqüente eliminação dos sais, é um fator central que favorece a salinização dos solos. Em adição aos fatores naturais, o processo de salinização dos solos pode ter um importante componente antrópico, devido ao manejo inadequado da água e do solo, notadamente nos sistemas de cultivo irrigados (Ayers & Westcot, 1991; Yeo, 1999). Nesse caso, o acúmulo de sais resulta do uso de água de baixa qualidade, métodos de irrigação inadequados e sistemas

de drenagem insuficientes. Dessa forma, a salinidade atinge, principalmente, as áreas irrigadas situadas nas regiões áridas e semi-áridas, onde a alta demanda evaporativa do ar associada à baixa precipitação e baixa disponibilidade de recursos hídricos de boa qualidade contribuem para a acumulação dos sais nas camadas superficiais do solo (Daker, 1976).

No mundo, estima-se que 19,5% das terras irrigadas (45 milhões de hectares) e 2,1% das não irrigadas (32 milhões de hectares) estejam afetadas pelos sais (FAO, 2000). A salinização dos solos é particularmente evidente nas regiões áridas e semi-áridas, atingindo cerca de 25% das áreas irrigadas. Atualmente, estima-se que o mundo perde cerca de 1,5 milhões de hectares de terras aráveis a cada ano devido ao acúmulo de sais (FAO, 2000). Dessa forma, a salinização tem sido identificada como o principal processo de degradação dos solos.

No Brasil, embora a informação sobre as áreas salinas não esteja bem definida, estima-se que 20 a 25% das áreas irrigadas enfrentam problemas de salinização (FAO, 2000). Este problema é mais conspícuo na região Nordeste, a qual possui uma área de 155 milhões de hectares, sendo que 52% dessa superfície é semi-árida (Lira et al., 1982). Considerando que a prática da irrigação constitui a única maneira de garantir a produção agrícola com segurança no semi-árido e que a implantação dos projetos de irrigação tem sido incrementada nas últimas décadas, este problema configura-se como de grande importância para a produção agrícola nessa região, face as projeções futuras de aumento da população e da demanda por alimentos.

1.3. Efeitos da Salinidade Sobre as Plantas

Os efeitos da salinidade sobre as plantas tem sido foco de pesquisas nos últimos 100 anos, em virtude do sal inibir o crescimento das plantas em grandes áreas do globo, mais do que qualquer outra substância inibidora presente no ambiente normal (Epstein, 1975). De

maneira geral, a inibição do crescimento das plantas pelo estresse salino pode ser consequência dos efeitos osmóticos, provocando déficit hídrico e/ou da acumulação excessiva de íons, que pode causar toxicidade, desequilíbrios nutricionais ou ambos (Greenway & Munns, 1980; Munns & Termaat, 1986; Cusido et al., 1987; Boursier & Läuchli, 1990). Entretanto, o grau com que cada um destes componentes do estresse salino afeta o crescimento depende de fatores intrínsecos da planta (genótipo e estágio de desenvolvimento), fatores relacionados com o estresse (tipo de salinidade, intensidade, duração e forma de aplicação do estresse) e fatores ambientais (luz, temperatura, umidade relativa do ar e sistema de cultivo), bem como da interação entre eles (Cramer et al., 1994; Bray et al., 2000).

1.3.1. Salinidade e crescimento

A redução no crescimento de plantas halófitas e glicófitas cultivadas em ambientes salinos já é reportado na literatura há várias décadas (Flowers et al., 1977; Greenway & Munns, 1980). O sinal primário que leva à redução do crescimento é, provavelmente, hídrico. A redução no potencial hídrico da solução nutritiva pode causar interrupção do influxo de água ou uma redução da turgescência celular na epiderme da raiz (Cramer & Bowman, 1991a). Assim, plântulas de milho submetidas a 80 mM de NaCl apresentaram paralisação da taxa de alongamento foliar após uma hora de exposição à salinidade (Cramer & Bowman, 1991b). Analogamente ao observado para as folhas, a taxa de alongamento de raízes primárias de milho foi inibida após duas horas de permanência em solução nutritiva contendo 100 mM de NaCl (Neumann et al, 1994). Após longos períodos de exposição ao NaCl, a inibição da alongamento celular foi irreversível, sugerindo que, a curto prazo, esta inibição é uma resposta ao estresse hídrico e, a longo prazo, é uma resposta aos efeitos específicos dos íons associados ao estresse hídrico (Cramer, 1992). Estes estudos suportam a hipótese de que, sob condições salinas, o crescimento pode ser inibido pela redução na turgescência celular e pelas

limitações metabólicas, as quais podem ser causadas por toxicidade iônica devido à acumulação de sódio e/ou cloreto utilizados para ajustamento osmótico (Greenway & Munns, 1980).

O reconhecimento da importância do tempo levou ao estabelecimento do modelo de RESPOSTA BIFÁSICA DE CRESCIMENTO para explicar os efeitos do estresse salino sobre o crescimento das glicófitas em geral (Munns, 1993, 2002). A primeira fase de redução do crescimento é rapidamente aparente, e seria devida ao sal no meio externo. Seria essencialmente um estresse hídrico ou “fase osmótica”, para a qual há uma variação genotípica surpreendentemente pequena. A redução do crescimento seria regulada, presumivelmente, por sinais hormonais provenientes das raízes. Então, há uma segunda fase de redução do crescimento que leva tempo para se desenvolver e resulta do dano interno. Isto seria devido à acumulação de níveis excessivos de sais nas folhas, excedendo a habilidade das células para compartimentalizá-los no vacúolo. Consequentemente, o crescimento das folhas mais jovens seria inibido pela redução no suprimento de carboidratos para as células em crescimento. É possível que as desordens metabólicas também resultem de mudanças necessárias sob condições de salinidade. À medida que as células são expostas ao NaCl, o fluxo de carbono pode ser alterado para atender à biossíntese de solutos osmóticos e a geração de energia necessária para esta biossíntese, além de outros processos importantes para o ajustamento osmótico (Binzel et al., 1985). Esta segunda fase é a que separa claramente espécies e genótipos que diferem na habilidade para tolerar a salinidade (Munns, 2002). Dessa forma, o estudo de longo prazo é condição fundamental na identificação e compreensão de mecanismos fisiológicos e bioquímicos significativos para a seleção de plantas tolerantes à salinidade.

O milho, que é uma espécie moderadamente sensível à salinidade, pois em média sua produção de matéria seca começa a cair a partir de $1,6 \text{ dS.m}^{-1}$ de condutividade elétrica (CE)

no extrato saturado da solução do solo (o que equivale a aproximadamente 30 mM de NaCl na solução nutritiva). Acima deste valor, a produção decresce cerca de 7,4% para cada unidade de incremento na CE (Maas, 1993). Dessa forma, a redução no crescimento de plantas de milho cultivadas em ambientes salinos tem sido amplamente citada na literatura (Totawat & Mehta, 1985; Hasaneen et al., 1994; Saneoka et al., 1995; Azevedo Neto & Tabosa, 2000a; Azevedo Neto et al., 2004).

1.3.2. Salinidade e ajustamento osmótico

O ajustamento osmótico ou osmorregulação, é um processo pelo qual o potencial hídrico pode ser diminuído sem que haja decréscimo da turgescência ou do volume celular e resulta do aumento líquido no conteúdo de solutos na célula (Taiz & Zeiger, 2004). Existem algumas controvérsias quanto ao uso deste termo, pois enquanto a osmorregulação normalmente é discutida em relação à habilidade das células de diminuir seu potencial osmótico em resposta ao estresse hídrico externo, a homeostase osmótica representa, indiscutivelmente, um aspecto mais geral da fisiologia e bioquímica, tanto a nível celular como de planta (Wyn Jones & Gorham, 1983). Considerando que o termo osmorregulação tem sido largamente utilizado na literatura e faz parte do senso comum, muitas particularidades relacionadas com o controle das concentrações de solutos a nível celular e de planta inteira precisam ser consideradas dentro do termo geral "osmorregulação".

Este fenômeno é mantido pela acumulação e perda regulada de íons inorgânicos e de solutos orgânicos de baixa massa molecular (Strange, 2004), tornando possível a manutenção da absorção de água e da pressão de turgescência da célula o que pode contribuir para a manutenção de processos fisiológicos, tais como: abertura estomática, fotossíntese, alongamento e divisão celulares (Serraj & Sinclair, 2002). O ajustamento osmótico representa, assim, um importante mecanismo de aclimação das plantas às condições de seca

ou de salinidade (Taiz & Zeiger, 2004).

O ajustamento osmótico ocorre tanto em halófitas como em glicófitas, entretanto a forma como as plantas o realizam depende, evidentemente, da espécie considerada e da rapidez com que o potencial hídrico do meio externo à raiz é reduzido (Prisco, 1980). Se a planta for submetida a um choque osmótico (p.ex. diminuição abrupta do potencial hídrico da solução pela adição de polietileno glicol ou de NaCl), a fase inicial do ajustamento osmótico será a desidratação, resultando no abaixamento do potencial osmótico celular. Em seguida, a célula poderá acumular solutos inorgânicos e orgânicos, promovendo o ajustamento osmótico. Se a redução do potencial hídrico do meio externo ocorrer gradualmente, como acontece normalmente em condições de campo, a planta não deverá sofrer o processo de desidratação inicial e poderá manter sua homeostase osmótica através da absorção de sais e/ou pela síntese de solutos orgânicos (Prisco, 1980). Tanto em condições de seca como de salinidade, o íon K^+ e os compostos orgânicos são os solutos mais importantes para o ajustamento osmótico em células pouco vacuoladas, enquanto que os íons K^+ , Na^+ e Cl^- são os principais solutos em células altamente vacuoladas (Wyn Jones & Gorham, 1983).

Sob estresse salino, um fator chave na acumulação de solutos em células vacuoladas é a sua compartimentalização subcelular. À medida que quantidades excessivas de íons entram no citoplasma, eles inibem as atividades de muitas enzimas. Um mecanismo de proteção importante é a compartimentalização destes íons no vacúolo, onde contribuirão para o ajustamento osmótico sem afetar os sistemas enzimáticos do citoplasma. Nestas células, o balanço hídrico entre o vacúolo e o citoplasma é mantido pela síntese e acúmulo de compostos orgânicos (Taiz & Zeiger, 2004). Em adição, o acúmulo destes compostos no citoplasma pode proteger as membranas celulares, as proteínas e a maquinaria metabólica, o que pode preservar a estrutura subcelular dos danos resultantes da desidratação (Serraj & Sinclair, 2002). Como o volume do citoplasma nas células do mesófilo e do córtex radicular

R13839082

representa, em média, 10% do volume celular, a quantidade de carbono necessária à síntese de solutos orgânicos para o ajustamento osmótico é, em geral, relativamente pequena.

Embora os solutos inorgânicos e orgânicos desempenhem um importante papel no crescimento das plantas superiores sob condições de salinidade, sua contribuição relativa varia entre espécies, entre cultivares de uma mesma espécie, entre órgãos e tecidos de uma mesma planta e até entre os diferentes compartimentos de uma mesma célula (Ashraf & Harris, 2004). Dessa forma, a capacidade para acumular e compartimentalizar solutos inorgânicos, bem como sintetizar e acumular solutos orgânicos pode ser um fator adicional favorecendo o crescimento das plantas em ambientes salinos.

1.3.3. Salinidade e íons inorgânicos

Uma característica geral de muitas plantas cultivadas em ambientes salinos é a manutenção da turgescência pela acumulação de solutos inorgânicos em suas células (Flowers et al., 1977). Assim, os íons inorgânicos desempenham um importante papel na preservação do potencial hídrico vegetal. O armazenamento de íons no vacúolo permite que a planta mantenha a turgescência sem desprendimento de energia para a síntese de solutos orgânicos (Martinoia et al., 1986). Contudo, esta acumulação de íons pode causar problemas de toxicidades iônicas, deficiências nutricionais ou ambos (Greenway & Munns, 1980; Munns & Termaat, 1986).

Diversos trabalhos na literatura demonstram que a salinidade promove um aumento nos teores de sódio e cloreto, tanto em halófitas (Flowers et al., 1977) como em glicófitas (Greenway & Munns, 1980). Em milho, o acúmulo destes íons também tem sido descrito por diversos autores (Boursier et al., 1987; Hajibagheri et al., 1987; Cramer et al., 1994; Azevedo Neto & Tabosa, 2000b; Azevedo Neto et al., 2004). Em geral, o excesso de sódio no meio radicular interfere nos processos de absorção, transporte e utilização dos íons K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}

(Marschner, 1995). Dessa forma, plantas de milho cultivadas em condições de salinidade apresentam redução nos teores de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , tanto na parte aérea como nas raízes (Kawasaki et al., 1983; Alberico & Cramer (1993); Cramer et al. (1994); Azevedo Neto & Tabosa, 2000b). O aumento nas concentrações de Na^+ com concomitante redução nas concentrações de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , aumenta excessivamente as relações Na^+/K^+ , Na^+/Ca^{2+} e Na^+/Mg^{2+} (Chavan & Karadge, 1986; Rogers & Noble, 1992; Ullah et al., 1993; Araújo, 1994; Azevedo Neto & Tabosa, 2000b), podendo causar distúrbios na homeostase iônica.

Considerando que a manutenção de concentrações adequadas dos nutrientes essenciais, bem como de um balanço iônico favorável é fundamental para a função celular normal, sob condições de estresse salino (Greenway & Munns, 1980), o estudo da nutrição mineral é muito importante no que diz respeito a tolerância à salinidade.

1.3.4. Salinidade e solutos orgânicos

Uma alteração metabólica comum à maioria das plantas é o acúmulo de solutos orgânicos de baixa massa molecular. Estes solutos podem incluir: 1 – ácidos orgânicos (malato, oxalato, etc.); 2 - compostos poliídrolícos tais como carboidratos solúveis (glicose, frutose, sacarose, trealose ou rafinose), poliálcoois de cadeia linear (glicerol, manitol ou sorbitol) e poliálcoois cíclicos (inositol, ononitol ou pinitol) e 3 - alquilaminas zwitteriônicas, tais como aminoácidos protéicos (arginina, glicina, serina, etc.), aminoácidos não protéicos (citrulina, ornitina, etc.), iminoácidos (prolina ou hidroxiprolina), amidas (glutamina ou asparagina), betaínas (glicina betaína, alanina betaína ou prolina betaína), a diamina putrescina, a triamina espermidina e a poliamina espermina. Plantas sob deficiência de nitrogênio freqüente podem acumular o propionato de dimetilsulfônio, um composto terciário de sulfônio equivalente às betaínas (Rabe, 1990; Zhu, 2001a; Ashraf & Harris, 2004).

Ao contrário dos solutos inorgânicos, os solutos orgânicos, mesmo em altas

concentrações, não interferem no metabolismo celular normal (Sairam & Tyagi, 2004). Por esta razão, estes compostos são também chamados de solutos compatíveis, osmólitos compatíveis ou metabólitos compatíveis. Embora as moléculas destes compostos não sejam muito carregadas, são polares, altamente solúveis e possuem uma grande camada de hidratação. Dessa forma, elas são facilmente solubilizadas e podem interagir diretamente com as macromoléculas (Sairam & Tyagi, 2004).

Em altas concentrações, os solutos compatíveis certamente funcionam no ajustamento osmótico. As maiores concentrações destes solutos residem principalmente no citosol, promovendo o balanço hídrico entre o apoplasto, o citoplasma e o vacúolo (Greenway & Munns, 1980; Bray, et al., 2000; Zhu, 2001b; 2002). Sob condições de estresse, estes solutos podem ser acumulados em quantidades tão grandes quanto 5 a 10% do peso de matéria seca do tecido (Naidu et al., 1992). Além de seu papel estritamente osmótico, alguns solutos orgânicos podem auxiliar na estabilização das proteínas, complexos protéicos e membranas, na manutenção das homeostases iônica e osmótica, e como reserva de carbono e nitrogênio (Bohnert & Shen, 1999; Bray et al., 2000). Adicionalmente, podem contribuir no controle do pH citosólico e na desintoxicação do excesso de NH_4^+ (Gilbert et al., 1998). Modelos atuais sugerem que pequenas quantidades de solutos compatíveis também podem proteger as plantas, removendo radicais livres do oxigênio gerados pelo estresse oxidativo secundário (Smirnoff & Cumbes, 1989; Zhu, 2001b; 2002).

Dentre os solutos orgânicos que podem ser acumulados em plantas cultivadas sob estresse, a prolina tem, incontestavelmente, recebido maior atenção. O acúmulo de prolina em tecido vegetal foi primeiramente observado por Kemble & MacPherson (1954), resultando no incremento dos estudos com prolina em plantas sob estresse. Em adição, também foi verificado o acúmulo de diversos outros solutos orgânicos em células de plantas estressadas. Como consequência, enquanto muitos trabalhos indicam uma correlação positiva entre o

acúmulo de prolina e a aclimação aos estresses hídrico e salino, o mesmo não é corroborado por outros estudos (maiores detalhes nas revisões de Delauney & Verma, 1993; Hare & Cress, 1997; Hare et al., 1998; Hare et al., 1999; Ashraf & Harris, 2004). Dessa forma, até o momento ainda permanece a pergunta se a acumulação de prolina em tecidos vegetais fornece uma vantagem adaptativa para plantas estressadas ou se é meramente uma consequência circunstancial de outras mudanças no metabolismo induzidas pelo estresse. Neste cenário, é conveniente considerar a hipótese de Delauney & Verma (1993), de que a ausência de uma correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a osmorregulação em algumas espécies não nega um papel adaptativo para a prolina. Nestas espécies, este fato pode refletir a predominância de outros mecanismos adaptativos, tais como alterações morfológicas (p.ex. desenvolvimento de sistema radicular mais profundo), desenvolvimentais (p.ex. redução do tempo de floração), fisiológicas (p.ex. seqüestro de íons no vacúolo) ou bioquímicas (p.ex. síntese e acúmulo preferenciais de outros solutos orgânicos). Em resumo, a avaliação do significado funcional do processo de acumulação de prolina e demais solutos compatíveis deve ser feita sempre holisticamente, no contexto de outros mecanismos disponíveis que favoreçam os processos de aclimação e adaptação aos estresses (Hare & Cress, 1997).

1.3.5. Salinidade e estresse oxidativo

Um outro aspecto comum aos estresses ambientais é o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}), as quais são altamente reativas e podem alterar o metabolismo celular normal (Alscher et al., 1997).

As plantas têm sistemas antioxidativos de defesa (não enzimáticos e enzimáticos) presentes em diversos compartimentos subcelulares que, usualmente, são suficientes para evitar o dano oxidativo durante períodos de crescimento sob condições normais e de estresse

moderado (Bray et al., 2000). Entretanto, quando estressadas severamente, a produção de ROS pode exceder a capacidade de neutralização dos sistemas antioxidativos e o dano oxidativo pode ocorrer (Kang & Saltveit, 2001). Os sistemas não enzimáticos incluem antioxidantes de baixa massa molecular, hidrofílicos, como o ácido ascórbico e a glutathione reduzida, ou lipofílicos, como o α -tocoferol e os carotenóides (McKersie & Leshem, 1994). Os enzimáticos incluem as enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases não específicas (POX) e as enzimas do ciclo ascorbato-glutathione (ou via enzimática Halliwell-Asada): peroxidase do ascorbato (APX), redutase do monodesidroascorbato (MDHAR), redutase do desidroascorbato (DHAR) e redutase da glutathione (GR) (Shalata et al., 2001).

O radical superóxido é produzido regularmente nos cloroplastos e mitocôndrias, embora pequenas quantidades também sejam produzidas nos peroxissomos, glioxissomos e retículo endoplasmático (McKersie & Leshem, 1994). A SOD, enzima presente em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos, converte o O_2^{\bullet} a H_2O_2 , o qual é metabolizado a H_2O pela CAT e diferentes classes de peroxidases. A CAT, que é encontrada em peroxissomos, citosol e mitocôndrias, dismuta H_2O_2 em H_2O e O_2 . As peroxidases (POX e APX) são distribuídas por toda a célula e catalisam a redução do H_2O_2 a H_2O . A POX, que é encontrada no citosol, vacúolo e parede celular, é pouco específica quanto ao substrato doador de elétrons e decompõe H_2O_2 pela oxidação de co-substratos tais como compostos fenólicos (p.ex. guaiacol ou pirogalol) ou ascorbato. Já a APX, que como as demais enzimas do ciclo ascorbato-glutathione é encontrada em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos, catalisa o primeiro passo do ciclo ascorbato-glutathione, reduzindo o H_2O_2 a H_2O às custas da oxidação de ascorbato a monodesidroascorbato, o qual é reduzido novamente a ascorbato pela ação da MDHAR. Alternativamente, duas moléculas de monodesidroascorbato podem dismutar-se não enzimaticamente em uma de ascorbato e uma desidroascorbato. Este último é

reduzido a ascorbato através da rota DHAR e GR. Nesta rota, a glutatona é oxidada pela ação da DHAR e, em seguida, é novamente reduzida pela ação da GR. Independentemente da rota utilizada (via MDHAR ou DHAR e GR), a regeneração do ascorbato tem como doador final de elétrons o NADPH (Bray et al., 2000; Kang & Saltveit, 2001).

Como pode ser observado, os sistemas enzimáticos são destinados a minimizar as concentrações de superóxido e peróxido de hidrogênio, muito embora estas espécies químicas sejam menos tóxicas que o radical hidroxila. Entretanto, este radical pode ser produzido não enzimaticamente pela reação entre $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , na presença ou não de íons Fe^{2+} , através das reações de Fenton e de Haber-Weiss, respectivamente. Os radicais hidroxila podem causar danos oxidativos a lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas importantes, afetando severamente o metabolismo vegetal e, conseqüentemente, o crescimento e a produção (McKersie & Leshem, 1994; Alscher et al., 1997; Imlay, 2003; Sairam & Tyagi, 2004).

Nesta última década, resultados de numerosos estudos indicam que a redução nos danos oxidativos e o aumento da tolerância aos estresses ambientais, incluindo o estresse salino, estão correlacionados a sistemas antioxidativos (constitutivos ou induzidos) mais eficientes (Spychalla & Desborough, 1990; Cakmak & Marschner, 1992; Walker & McKersie, 1993; Prasad et al., 1994; Hernández et al., 1995; Foyer et al., 1997; Shalata & Tal, 1998; Mittova et al., 2000; Shalata et al., 2001).

Por outro lado, como a produção das ROS é inerente ao metabolismo celular normal, a pesquisa tem focalizado mais recentemente o possível papel sinalizador destas espécies químicas. Em plantas, tem sido aceito que as ROS, ao lado de outros mediadores tais como o Ca^{2+} , atuam como mensageiros secundários nas respostas aos estresses bióticos e abióticos e na sinalização hormonal (Pei et al., 2000). Dessa forma, devido as diversas condições de estresse causarem o desequilíbrio redox celular, os sinais redox são considerados, atualmente,

reguladores chave do metabolismo, morfologia e desenvolvimento vegetais (Foyer & Noctor, 2003).

Neste cenário, o H_2O_2 , que é relativamente estável e difusível através das membranas, é reconhecido como uma molécula de transdução de sinal, atuando em diversas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares, tanto a nível celular como de planta (Van Breusegem et al., 2001; Desikan et al., 2001; Foyer & Noctor, 2003; Neill et al., 2002a,b).

Considerando que a produção de H_2O_2 é aumentada em resposta a uma grande variedade de estresses bióticos e abióticos, esta espécie química desempenha um papel duplo nas plantas: em baixas concentrações atua como uma molécula mensageira envolvida na transdução de sinal, ativando a tolerância contra vários estresses abióticos e, em altas concentrações, ativa a morte programada da célula (Prasad et al., 1994; Van Breusegem et al., 2001; Neill et al., 2002a,b; Vandenabeele et al., 2003). Deste modo, parece provável que o acúmulo de H_2O_2 , em tecidos específicos e em quantidades apropriadas, pode ser um fator chave mediando os fenômenos da aclimação e da tolerância cruzada, em que a exposição prévia a um estresse pode induzir, respectivamente, tolerância à exposição subsequente do mesmo ou de diferentes estresses (Bowler & Fluhr, 2000).

A produção endógena de H_2O_2 em plântulas de milho aumentou em resposta ao frio e a aplicação exógena de H_2O_2 aumentou a tolerância das plantas ao estresse de baixa temperatura. Este aumento na tolerância foi devido, em parte, ao aumento na atividade do sistema antioxidativo, que evitou o acúmulo de ROS durante o estresse (Prasad et al., 1994). Microplantas de batata tratadas com H_2O_2 produziram explantes resistentes a um tratamento de calor normalmente letal (Lopez-Delgado et al., 1998). A aplicação de H_2O_2 em folhas de *Arabidopsis* aumentou a proteção contra o estresse foto-oxidativo induzido pelo excesso de luz (Karpinski et al., 1999). Uma importante evidência de que o H_2O_2 pode induzir a aclimação ao estresse salino foi obtida com plântulas de arroz pré-tratadas com vários níveis

de H_2O_2 (Uchida et al., 2002). Estes autores mostraram que em baixas concentrações ($< 10 \mu M$), o H_2O_2 induziu não apenas o aumento nas atividades das enzimas antioxidativas, mas também a expressão de genes relacionados com o estresse salino.

Diversos estudos têm fornecido evidências para o papel sinalizador do H_2O_2 (Foyer et al., 1997). Foi demonstrado que tanto a adição de H_2O_2 em tecidos vegetais quanto sua geração experimental atuam como um sinal na indução da expressão gênica da CAT (Prasad et al., 1994; Polidoros & Scandalios, 1999), da APX (Van Breusegem et al., 2001), das POX e da GR (Janda et al., 1999). Mudanças na homeostase do H_2O_2 também induzem a síntese de proteínas de choque térmico (HSP - *heat shock proteins*) e ativa as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK - *mitogen-activated protein kinase*) (Kovtun et al., 2000; Van Breusegem et al., 2001). Em adição, utilizando a tecnologia do cDNA *microarray*, foram identificadas 175 ESTs (*expressed sequence tags*) não redundantes, reguladas pelo H_2O_2 (Desikan et al., 2001).

Tendo em vista que as mudanças na homeostase do H_2O_2 são eventos sinalizadores centrais nas vias de transdução de sinal, a compreensão dos mecanismos envolvidos na relação entre oxidantes e sistema antioxidativo, são de grande importância para o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos dos fenômenos de aclimação e tolerância cruzada nas espécies vegetais.

1.4. Objetivos

Diante do exposto, o presente trabalho visou a obtenção de dados básicos que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos responsáveis pela inibição do crescimento de plantas de milho cultivadas sob condições de estresse salino. Estas informações poderão subsidiar os melhoristas que estejam interessados no desenvolvimento de cultivares menos susceptíveis à salinidade, bem como servir de base na orientação de

pesquisas aplicadas que tenham como objetivo estabelecer técnicas de manejo que assegurem uma melhor convivência desta cultura com o estresse.

1.5. Referências Bibliográficas

ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias do Milho). Estatísticas. 2004. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatistica4.htm>>. Acesso em 8 novembro 2004.

ALBERICO, G. L.; CRAMER, G. R. Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? I. Preliminary screening of seven cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 16, p. 2289-2303, 1993.

ALMEIDA, T. C. Utilização do milho e do sorgo no Brasil. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (Eds.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, SP, POTAFOS, 1993. p. 11-21.

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

ARAÚJO, C. A. S. **Avaliação de feijoeiros quanto à tolerância à salinidade em solução nutritiva**. Viçosa, MG: UFV, 1994. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa. 87p.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Tradução de GHEYI, H. R.; MEDEIROS, J. F.; DAMASCENO, F. A. V. Campina Grande, PB: UFPB, 1991. 218 p.

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

AZEVEDO NETO, A. D.; TABOSA, J. N. Estresse salino em plântulas de milho: I. Análise do crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, p. 159-164, 2000a.

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

BINZEL, M. L.; HASEGAWA, P. M.; HANDA, A. K.; BRESSAN, R. A. Adaptation of tobacco cells to NaCl. **Plant Physiology**, v. 79, p. 118-125, 1985.

BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 237-260, 1999.

- BOURSIER, P.; LÄUCHLI, A. Growth responses and mineral nutrient relations of salt-stressed sorghum. **Crop Science**, v. 30, p. 1226-1233, 1990.
- BOURSIER, P.; LYNCH, J.; LÄUCHLI, A.; EPSTEIN, E. Chloride partitioning in leaves of salt-stressed sorghum, maize, wheat and barley. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 463-473, 1987.
- BOWLER C.; FLUHR R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 241-246, 2000.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: ASPP, 2000. p. 1158-1203.
- CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium-deficiency and high light-intensity enhance activities of superoxide-dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione-reductase in bean-leaves. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1222-1227, 1992.
- CHAVAN, P. D.; KARADGE, B. A. Growth, mineral nutrition, organic constituents and rate of photosynthesis in *Sesbania grandiflora* L. grown under saline conditions. **Plant and Soil**, v. 93, p. 395-404, 1986.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Safras – Milho. 2004. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 8 novembro 2004.
- CRAMER, G. R. Kinetics of maize leaf elongation: II. Responses of a Na-excluding cultivar and a Na-including cultivar to varying Na/Ca salinities. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 857-864, 1992.
- CRAMER, G. R.; ALBERICO, G. J.; SCHMIDT, C. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 21, p. 675-692, 1994.
- CRAMER, G. R.; BOWMAN, D. C. Kinetics of maize leaf elongation: I. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 1417-1426, 1991a.
- CRAMER, G. R.; BOWMAN, D. C. Short-term leaf elongation kinetics of maize in response to salinity are independent of the root. **Plant Physiology**, v. 95, p. 965-967, 1991b.
- CUSIDO, R. M.; PALAZON, J.; ALTABELLA, T.; MORALES, C. Effect of salinity on soluble protein, free amino acids and nicotine contents in *Nicotiana rustica* L. **Plant and Soil**, v. 102, p. 55-60, 1987.
- DAKER, A. **A água na agricultura**; manual de hidráulica agrícola. 7.ed. Rio de Janeiro, RJ: Freitas Bastos, 1988. 543 p.
- DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.
- DESIKAN, R.; MACKERNESS, S. A.-H.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, v. 127, p. 159-172, 2001.

- DUARTE, J. O. Embrapa Milho e Sorgo – Publicações – Sistema de Produção de Milho - Importância econômica. 2000. CRUZ, J. C.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (eds.). Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>>. Acesso em: 8 novembro 2004.
- EPSTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas**; princípios e perspectivas. Rio de Janeiro, RJ: Livros Técnicos e Científicos, 1975. 341 p.
- FAO. Statistical databases - Agriculture - Agricultural Production – Crops Primary. 2004. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>>. Acesso em: 8 novembro 2004.
- FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>>. Acesso em: 10 maio 2002.
- FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 28, p. 89-121, 1977.
- FOYER, C. H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J. F.; SCOTT, I. M. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 241-254, 1997.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364, 2003.
- GILBERT, G. A.; GADUSH, M. V.; WILSON, C.; MADORE, M. A. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 107-114, 1998.
- GODOY, L. J. G. **Manejo do nitrogênio em cobertura na cultura do milho (*Zea mays* L.) em solo arenoso baseado no índice relativo de clorofila**. Botucatu, SP: UNESP, 2002. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista. 94p.
- GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-90, 1980.
- HAJIBAGHERI, M. A.; HARVEY, D. M. R.; FLOWERS, T. J. Quantitative ion distribution within root cells of salt-sensitive and salt-tolerant maize varieties. **New Phytologist**, v. 105, p. 367-379, 1987.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 21, p. 535-553, 1998.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 413-434, 1999.

HASANEEN, M. N. A.; EL-SAHT, H. M.; BASSYONI, F. M. Growth, carbohydrates and associated invertase and amylase activities in castor bean and maize as affected by metribuzin and NaCl. **Biologia Plantarum**, v. 36, p. 451-459, 1994.

HELFAND, S. M.; REZENDE, G. C. **Mudanças na distribuição espacial da produção de grãos, aves e suínos no Brasil: o papel do Centro-Oeste**. Rio de Janeiro, RJ: IPEA (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada), 1998, 38 p.

HERNÁNDEZ, J. A.; OLMOS, E.; CORPAS, F. J.; SEVILLA, F.; del RIO, L. A. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. **Plant Science**, v. 105, p. 151-167, 1995.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Agropecuário de 1995-1996. 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro>>. Acesso em 8 novembro 2004.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 395-418, 2003.

JANDA, T.; SZALAI, G.; TARI, I.; PÁLDI, E. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. **Planta**, v. 208, p. 175-180, 1999.

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.

KARPINSKI, S.; REYNOLDS, H.; KARPINSKA, B.; WINGSLE, G.; CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. **Science**, v. 284, p. 654-657, 1999.

KAWASAKI, T.; AKIBA, T.; MORITSUGU, M. Effects of high concentrations of sodium chloride and polyethylene glycol on the growth and ion absorption in plants: I. Water culture experiments in a greenhouse. **Plant and Soil**, v. 75, p. 75-85, 1983.

KEMBLE, A. R.; MacPHERSON, H. T. Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. **Biochemical Journal**, v. 58, p. 46-59, 1954.

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

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

LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J. F.; FOYER, C. H.; SCOTT, I. M. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 713-720, 1998.

MAAS, E. V. Testing crops for salinity tolerance. In: MARANVILLE, J. W.; BALIGAR, B. V.; DUNCAN, R. R.; YOHE, J. M. (Eds.). **Proceedings workshop on adaptation of plants to soil stresses**. Lincoln: INTSORMIL, 1993. p. 234-247.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MARTINOIA, E.; SCHRAMM, M. J.; KAISER, G.; KAISER, W. M.; HEBER, U. Transport of anions in isolated barley vacuoles: I. Permeability to anions and evidence for a Cl⁻uptake system. **Plant Physiology**, v. 80, p. 895-901, 1986.

McKERSIE, B. D.; LESHEM, Y. Y. **Stress and stress coping in cultivated plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 256 p.

MITTOVA, V.; VOLOKITA, M.; GUY, M.; TAL, M. Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. **Physiologia Plantarum**, v. 110, p. 42-51, 2000.

MUNNS, R. Physiological processes limiting plant growth on saline soils: some dogmas and hypotheses. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 15-24, 1993.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 239-250, 2002.

MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole plant responses to salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 143-160, 1986.

NAIDU, B. P.; PALEG, L. G.; JONES, G. P. Nitrogenous compatible solutes in drought-stressed *Medicago spp.* **Phytochemistry**, v. 31, p. 1195-1197, 1992.

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

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1237-1247, 2002b.

NEUMANN, P. M.; AZAIZEH, H.; LEON, D. Hardening of root cell walls: a growth inhibitory response to salinity stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, p. 303-309, 1994.

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais do melhoramento do milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, SP: POTAFOS, 1993. p. 23-42.

PEI, Z.-M.; MURATA, Y.; BENNING, G.; THOMINE, S.; KLÜSENER, B.; ALLEN, G. J.; GRILL, E.; SCHROEDER, J. I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. **Nature**, v. 406, p. 731-734, 2000.

PINAZZA, L. A. Perspectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, SP: POTAFOS, 1993. p. 1-10.

- POLIDOROS, A.; SCANDALIOS, J. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione-S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). **Physiologia Plantarum**, v. 106, p. 112-120, 1999.
- PRASAD, T. K.; ANDERSON, M. D.; MARTIN, B. A.; STEWART, C. R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **The Plant Cell**, v. 6, p. 65-74, 1994.
- PRISCO, J. T. Alguns aspectos da fisiologia do "stress" salino. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, p. 85-94, 1980.
- RABE, E. Stress physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. **Journal of Horticultural Science**, v. 65, p. 231-243, 1990.
- RICHARDS, L. A. **Suelos salinos y sodicos; diagnostico y rehabilitacion**. 6.ed. Mexico: Editorial Limusa, 1974. 172 p.
- ROGERS, M. E.; NOBLE, C. L. Variation in growth and ion accumulation between two selected populations of *Trifolium repens* L. differing in salt tolerance. **Plant and Soil**, v. 146, p. 131-136, 1992.
- SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v. 86, p. 407-421, 2004.
- SANEOKA, H.; NAGASAKA, C.; HAHN, D. T.; YANG, W. J.; PREMACHANDRA, G. S.; JOLY, R. J.; RHODES, D. Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. **Plant Physiology**, v. 107, p. 631-638, 1995.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 333-341, 2002.
- SHALATA, A.; TAL, M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 169-174, 1998.
- 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.
- SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.
- SPYCHALLA, J. P.; DESBOROUGH, S. L. Superoxide dismutase, catalase, and alpha-tocopherol content of stored potato tubers. **Plant Physiology**, v. 94, p. 1214-1218, 1990.
- STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Advances in Physiology Education**, v. 28 p. 155-159, 2004.
- SUASSUNA, J. **Semi-árido: proposta de convivência com a seca**. 2002. Recife, PE: FUNDAJ, 2002. 14 p.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**, Tradução de SANTARÉM, E. R. et al. 3.ed. Porto Alegre, RS: ARTMED, 2004. 719 p.
- TAVARES, C. E. C. CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Conjunturas Agropecuárias - Milho - Análise prospectiva do mercado de milho: Safra 2004/05. 2004. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 8 novembro 2004. 20 p.
- TOTAWAT, K. L.; MEHTA, A. K. Salt tolerance of maize and sorghum genotypes. **Annals of Arid Zone**, v. 24, p. 229-236, 1985.
- UCHIDA, A.; JAGENDORF, A. T.; HIBINO, T.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, v. 163, p. 515-523, 2002.
- ULLAH, S. M.; SOJA, G.; GERZABEK, M. H. Ion uptake, osmoregulation and plant-water relations in faba beans (*Vicia faba*, L.) under salt stress. **Die Bodenkultur**, v. 44, p. 291-301, 1993.
- VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.
- VANDENABEELE, S.; VAN DER KELEN, K.; DAT, J.; GADJEV, I.; BOONEFAES, T.; MORSA, S.; ROTTIERS, P.; SLOOTEN, L.; VAN MONTAGU, M.; ZABEAU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEN, F. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 23, p. 16113-16118, 2003.
- WALKER, M. A.; MCKERSIE, B. D. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 234-239, 1993.
- WYN JONES, R. G.; GORHAM, J. Osmoregulation. In: LANGE, D. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. **Encyclopedia of Plant Physiology: physiological plant ecology**. III. Response to chemical and biological environment. Berlin: Springer-Verlag, 1983. p. 35-58.
- YEO, A. Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 159-174, 1999.
- ZHU, J.-K. Plant salt stress. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-3, 2001a.
- ZHU, J.-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 66-71, 2001b.
- ZHU, J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

CAPÍTULO 2

Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes

(Cópia do trabalho publicado no Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 16, p. 31-38, 2004, obedecendo as normas deste periódico, excetuando-se a numeração da tabela e das figuras)

Abstract

Resumo

1. Introduction

2. Materials and methods

2.1. Growth conditions and treatments

2.2. Growth analysis

2.3. Transpiration, stomatal conductance, leaf temperature and leaf water potential

2.4. Na^+ , K^+ , amino acid and soluble carbohydrate contents

2.5. Experimental design and statistical analysis

3. Results

3.1. Growth analysis

3.2. Transpiration and leaf water potential

3.3. Na^+ , K^+ , amino acid and soluble carbohydrate contents

3.4. Plant growth, solute accumulation and predawn leaf water potential relationships

4. Discussion

Acknowledgments

5. References

Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes

André Dias de Azevedo Neto¹, José Tarquinio Prisco², Joaquim Enéas-Filho², Claudivan Feitosa de Lacerda², José Vieira Silva², Paulo Henrique Alves da Costa² and Enéas Gomes-Filho^{2*}

¹*Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, Brazil;* ²*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, CP 6039, CEP 60455-900, Fortaleza, CE, Brazil;* *Corresponding author: egomesf@ufc.br

Abstract: Seeds from eight different maize genotypes (BR3123, BR5004, BR5011, BR5026, BR5033, CMS50, D766 and ICI8447) were sown in vermiculite, and after germination they were transplanted into nutrient solution or nutrient solution containing 100 mmol.L⁻¹ of NaCl and placed in a greenhouse. During the experimental period plant growth (dry matter, shoot to root dry mass ratio, leaf area, relative growth rate, and net assimilation rate), leaf temperature, stomatal conductance, transpiration, predawn water potential, sodium, potassium, soluble amino acids and soluble carbohydrate contents were determined in both control and salt stressed plants of all genotypes studied. Salt stress reduced plant growth of all genotypes but the genotypes BR5033 and BR5011 were characterized as the most salt-tolerant and salt-sensitive, respectively. Stomatal response of the salt-tolerant genotype was not affected by salinity. Among the studied parameters, shoot to root dry mass ratio, leaf sodium content and leaf soluble organic solute content showed no relation with salt tolerance, i.e., they could not be considered as good morpho-physiological markers for maize salt tolerance. In contrast,

sodium and soluble organic solutes accumulation in the roots as a result of salt stress appeared to play an important role in the acclimation to salt stress of the maize genotypes studied, suggesting that they could be used as physiological markers during the screening for salt tolerance.

Keywords: transpiration; growth analysis; osmoregulation; salinity; water relations; *Zea mays*.

Efeito do estresse salino sobre o crescimento, resposta estomática e acúmulo de solutos em diferentes genótipos de milho

Resumo: Sementes de oito genótipos de milho (BR3123, BR5004, BR5011, BR5026, BR5033, CMS50, D766 e ICI8447) foram semeadas em vermiculita e, após a germinação, transplantadas para vasos contendo solução nutritiva ou solução nutritiva com 100 mmol.L^{-1} de NaCl, em casa de vegetação. Durante o período experimental avaliaram-se, em plantas de todos os genótipos, sob condições de controle e estresse salino, os seguintes parâmetros: crescimento (matéria seca, relação de matéria seca parte aérea/raiz, área foliar, taxa de crescimento relativo e taxa de assimilação líquida), temperatura foliar, condutância estomática, transpiração, potencial hídrico antemanhã e teores de sódio, potássio, aminoácidos solúveis e carboidratos solúveis. O estresse salino reduziu o crescimento das plantas de todos os genótipos, sendo o BR5033 e o BR5011 caracterizados como tolerante e sensível ao estresse salino respectivamente. A resposta estomática do genótipo tolerante não foi influenciada pela salinidade. Entre os parâmetros estudados, a relação de matéria seca parte aérea/raiz e os teores de sódio e de solutos orgânicos nas folhas não mostraram relação com a tolerância à salinidade, isto é, não foram considerados bons marcadores morfo-fisiológicos para a tolerância à salinidade em milho. Em contraste, os teores de sódio e de solutos orgânicos nas raízes mostraram desempenhar um importante papel na aclimatação dos

genótipos estudados ao estresse salino, sugerindo que eles poderiam ser usados como marcadores fisiológicos durante a seleção para tolerância à salinidade.

Palavras-chave: transpiração, análise de crescimento, osmorregulação, salinidade, relações hídricas, *Zea mays*.

1. INTRODUCTION

Soil salinization is one of the major factors of soil degradation. It has reached 19.5 % of the irrigated land and 2.1 % of the dry-land agriculture existing on the globe (FAO, 2000). Salinity effects are more conspicuous in arid and semi-arid areas where 25 % of the irrigated land is affected by salts. Considering that 52 % of northeast Brazil is within semi-arid tropics (Lira et al., 1982) and the increase of salt-affected soils due to poor soil and water management in the irrigated areas, the salinity problem became of great importance for agriculture production in this region.

Salinity inhibition of plant growth is the result of osmotic and ionic effects and the different plant species have developed different mechanisms to cope with these effects (Munns, 2002). The osmotic adjustment, i. e., reduction of cellular osmotic potential by net solute accumulation, has been considered an important mechanism to salt and drought tolerance in plants. This reduction in osmotic potential in salt stressed plants can be a result of inorganic ion (Na^+ , Cl^- , and K^+) and compatible organic solute (soluble carbohydrates, amino acids, proline, betaines, etc) accumulations (Hasegawa et al., 2000). The osmotic adjustment in both roots and leaves contribute to the maintenance of water uptake and cell turgor, allowing physiological processes, such as stomatal opening, photosynthesis, and cell expansion (Serraj and Sinclair, 2002). In addition to their role in cell water relations, organic solute accumulation may also help towards the maintenance of ionic homeostasis and of the C/N ratio, removal of free radicals, and stabilization of macromolecules and organelles, such

as proteins, protein complexes and membranes (Bohnert and Shen, 1999, Bray et al., 2000). These solutes may also help towards the control of pH in the cytosol and detoxification of excess NH_4^+ (Gilbert et al., 1998).

Although the relationship between osmoregulation and salt tolerance is not clear, there is evidence that the osmotic adjustment appears, at least partially, to be involved in the salt tolerance of certain plant genotypes (Richardson and McCree, 1985). Therefore, the objective of this investigation was to evaluate the effects of salt stress on growth, water relations and gas exchange of different maize genotypes, commonly grown in northeast Brazil, and at the same time try to correlate these effects with changes in ionic and organic solute accumulation, with a view to a better understanding of the mechanisms of salt tolerance in these genotypes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Growth condition and treatments: seeds of eight different maize (*Zea mays*, L.) genotypes (five cultivars: BR5004, BR5011, BR5026, BR5033 and CMS50, two triple hybrids: BR3123 and ICI8447, and one simple hybrid: D766) used in northeast Brazil (Azevedo Neto and Tabosa, 1999), were obtained from the Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Recife, PE, Brazil. They were sown in trays containing vermiculite, watered daily and kept in a greenhouse. Five days from seedling emergence they were transferred to trays containing half-strength Hoagland's nutrient solution, and eight days later they were transferred to plastic pots containing 3 L of full strength nutrient solution (control treatment) or nutrient solution to which 100 mmol.L^{-1} of NaCl was added (salt stress treatment). Salt additions (25 mmol.L^{-1} NaCl per day) started at the time of transplantation into the plastic pots, and the plants from both treatments were grown under the same conditions for 15 d (end of the experimental period).

2.2. *Growth analysis*: at the end of the experimental period plants from both treatments were harvested, separated into roots, stem + leaf sheath, and leaf blade, for fresh and dry mass determinations as well as leaf area measurements. Dry mass (DM) was determined after drying the plant parts in an oven at 65°C for 72 h, and leaf area (LA) was measured with a LI-3000 leaf area meter (LI-COR, Inc. Lincoln, NE, USA). Growth analysis was evaluated according to Benincasa (1988), and the relative growth rate (RGR) and the net assimilation rate (NAR) determined as follows:

$$\text{RGR} = (\ln \text{DM}_2 - \ln \text{DM}_1) (t_2 - t_1)^{-1} \quad (\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$$

$$\text{NAR} = [(\text{DM}_2 - \text{DM}_1) (\text{LA}_2 - \text{LA}_1)^{-1}] [(\ln \text{LA}_2 - \ln \text{LA}_1) (t_2 - t_1)^{-1}] \quad (\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}) \text{ where}$$

DM₁ the initial total (shoot + root) dry mass, DM₂ the final total dry mass, LA₁ the initial leaf area, LA₂ the final leaf area, and (t₂ - t₁) the difference in time interval between the two samplings (15 d).

2.3. *Transpiration, stomatal conductance, leaf temperature and leaf water potential*: measurements of leaf temperature (T_l), stomatal conductance (g_s) and transpiration (E) were made on the median portion of the youngest fully expanded leaf, one day prior to plant sampling, at 8-9 a.m. Photosynthetic active radiation (PAR) during the measurements ranged from 900 to 1100 mmol.m⁻².sec⁻¹. A steady-state porometer, model LI-1600 (LI-COR, Inc. Lincoln, NE, USA) was used for the measurements. At the sampling date, the same leaves used for the above determinations were utilized for predawn leaf water potential (Y_w) measurements, using a model 3035 pressure chamber (Soil Moisture Equipment Corp, Santa Barbara, CA, USA).

2.4. Na^+ , K^+ , amino acids and soluble carbohydrates contents: the extract used for determination of ions and soluble carbohydrate contents was prepared by grinding 100 mg of dry tissue with 10 mL of distilled deionized water at 25°C for 1 h, centrifuging this material at 3,000 g_n for 5 min, and then filtering the supernatant through qualitative filter paper. An aliquot of this filtrate was used for Na^+ and K^+ determinations by flame photometry (Sarruge and Haag, 1974) and another for soluble carbohydrates determination according to Dubois et al. (1956), using D(+)-glucose as standard. The rest of this aqueous extract was further used for soluble amino acid extraction and determination.

For free amino acid determination, 0.5 mL of 10% trichloroacetic acid was added to an aliquot of 0.5 mL of the water extract and the mixture was kept at 25°C for 1 h. This mixture was then centrifuged at 12,000 g_n for 5 min, and the supernatant used for amino acid determination (Yemm and Cocking, 1955), using L-leucine as standard.

2.5. *Experimental design and statistical analysis*: the experimental design was a completely randomized factorial eight (genotypes) x two (salt levels) with three replicates. The means and their standard deviations or the Tukey test were used for comparing different treatments, and the coefficient of correlation (r) and the F-test were used for studying correlation between variables (Snedecor, 1956).

3. RESULTS

3.1. *Growth analysis*: salt stress reduced dry masses of both shoot (SDM) and root (RDM) of all maize genotypes, except RDM of genotype BR5033, which was not affected by salinity (figure 2.1). When subjected to salt stress, genotype BR5011 showed the largest SDM and RDM reductions (66.5 and 61.4%, respectively) while genotype BR5033 showed a 33.8% reduction in SDM and a lack of reduction in RDM. Salt stress did not affect SDM/RDM of

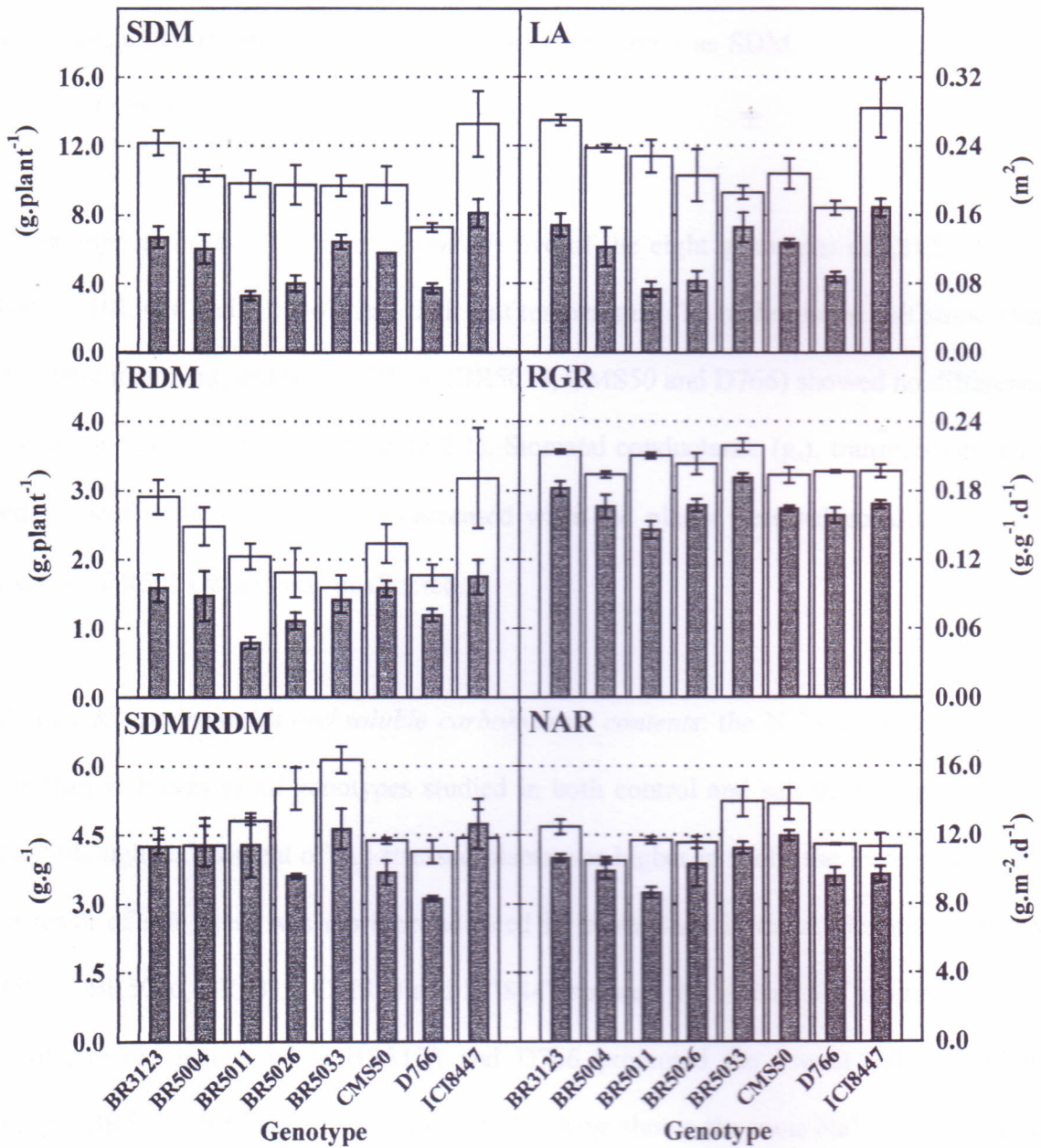


Figure 2.1. Shoot (SDM) and root (RDM) dry masses, shoot to root dry mass ratio (SDM/RDM), leaf area (LA), relative growth rate (RGR), and net assimilation rate (NAR) of eight maize genotypes grown under control (□) and salt stress (■) conditions. The columns represent the means \pm standard deviation.

genotypes BR3123, BR5004, BR5011 and ICI8447, but decreased the ratios for genotypes BR5026, BR5033, CMS50, and D766. In general, leaf area (LA), relative growth rate (RGR), and net assimilation rate (NAR) followed the same pattern as SDM, i. e., all genotypes had their LA, RGR and NAR inhibited by salt stress.

3.2. *Transpiration and leaf water potential*: five of the eight genotypes (BR3123, BR5004, BR5011, BR5026 and ICI8447) had their leaf temperature (T_l) higher in the salt stress than in the control treatment, and three of them (BR5033, CMS50 and D766) showed no difference in T_l , when subjected to salt stress (table 2.1). Stomatal conductance (g_s), transpiration (E) and predawn leaf water potential (Ψ_w) decreased when the plants were subjected to salt stress, except for BR5033 which was unaffected.

3.3. *Na⁺, K⁺, amino acids and soluble carbohydrate contents*: the Na⁺ content was higher in roots than in leaves of all genotypes studied in both control and salt stressed plants (figure 2.2). Although Na⁺ content of salt stressed plants was higher in roots, the increase of this ion as a result of salt stress was more pronounced in leaves than in roots. Genotypes BR5004, BR5011, BR5026, BR5033, CMS50 and ICI8447 showed the highest Na⁺ contents in leaves of salt stressed plants, while BR3123 and D766 presented the lowest values. Although BR5004, BR5011, BR5026, BR5033 and CMS50 have shown the same Na⁺ content in leaves, BR5011 and BR5026 were the only genotypes to present leaf ion toxicity symptoms. When root Na⁺ content of salt stressed plants was analyzed, BR3123, BR5004, BR5033, CMS50, D766, and ICI8447 showed the highest Na⁺ accumulations and BR5011 and BR5004 presented the lowest. BR5033 accumulated 26.4 % more Na⁺ in roots than BR5011.

Potassium in leaves was reduced as a result of salt stress for all genotypes, but the same did not happen for roots of the genotypes BR5004, BR5026 and BR5033 (figure 2.2). The

Table 2.1. Leaf temperature (T_l), stomatal conductance (g_s), transpiration (E) and predawn leaf water potential (Ψ_w) of eight maize genotypes grown under control and salt stress conditions. Mean followed by the same letter signify that control and salt stress treatments are not statistically different according to Tukey's test ($P < 0.05$), for each one of the studied parameter.

Genotype	T_l ($^{\circ}\text{C}$)		g_s ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		E ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		Ψ_w (MPa)	
	control	salt	control	salt	control	salt	control	salt
BR3123	29.83b	30.30a	108.33a	63.43b	3.13a	1.92b	-0.22a	-0.49b
BR5004	29.90b	30.40a	123.00a	71.27b	3.60a	2.16b	-0.24a	-0.51b
BR5011	30.30b	30.87a	99.50a	63.37b	3.00a	1.99b	-0.34a	-0.62b
BR5026	30.60b	31.03a	84.80a	51.63b	2.60a	1.68b	-0.21a	-0.37b
BR5033	31.37a	31.37a	102.27a	90.80a	3.26a	2.90a	-0.29a	-0.32a
CMS50	31.07a	31.17a	92.47a	76.80b	2.92a	2.43b	-0.15a	-0.37b
D766	30.33a	30.53a	83.43a	54.87b	2.51a	1.66b	-0.25a	-0.40b
ICI8447	30.53b	31.60a	95.93a	58.23b	2.92a	1.89b	-0.30a	-0.45b

genotype BR5011 showed a 31.6 % reduction in root K^+ as a result of salt stress while the BR5033 showed no significant reduction.

Salt stress increased the content of soluble amino acids in leaves from all genotypes studied and the highest increase (113 %) occurred in genotype BR5033 (figure 2.2). However, the only genotype that showed increase in root amino acids was BR5033. Leaf and root soluble carbohydrates for most genotypes decrease or stayed constant as a result of salt stress,

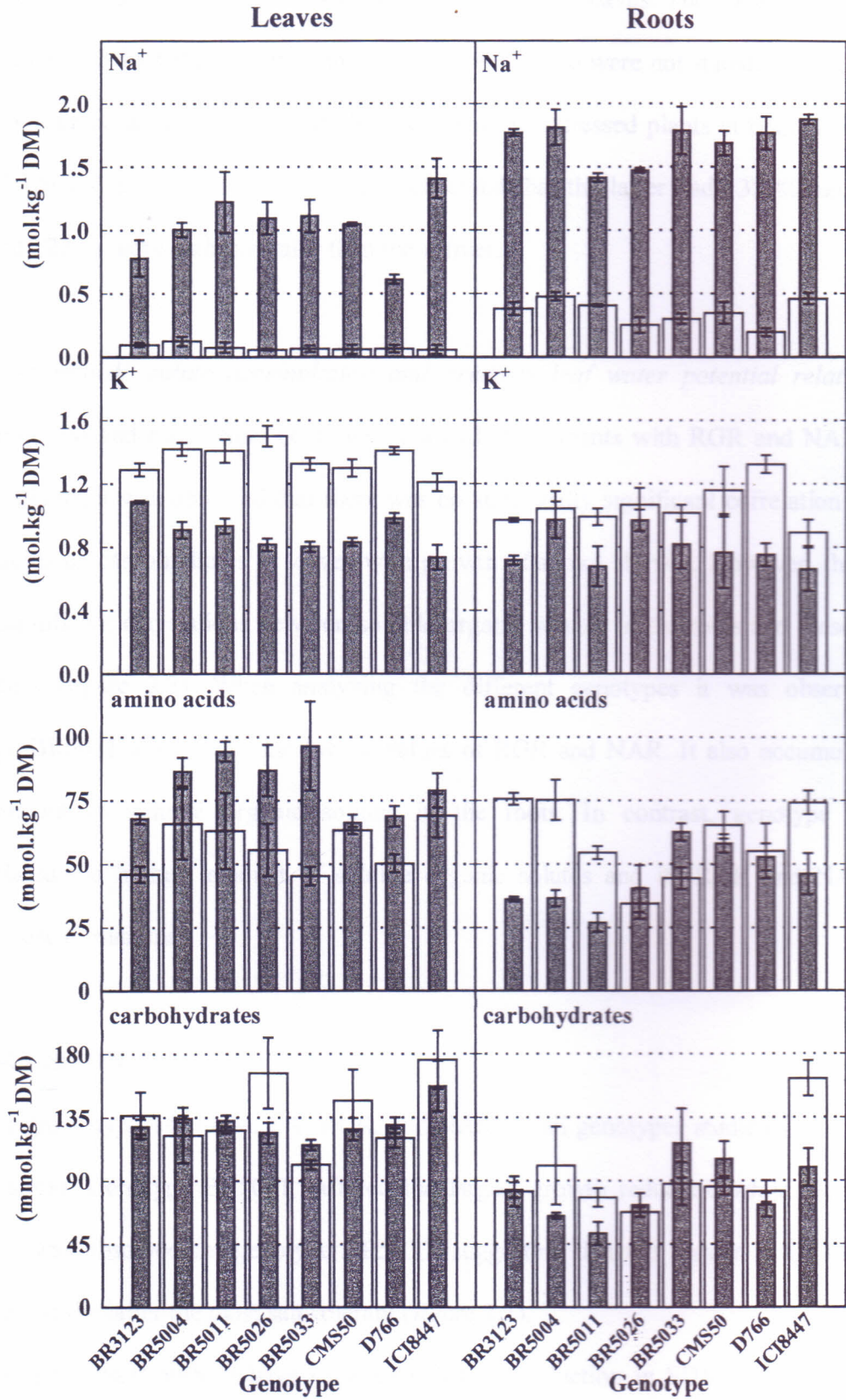


Figure 2.2. Sodium, potassium, soluble amino acids and soluble carbohydrates in leaves and roots of eight maize genotypes grown under control (□) and salt stress (▨) conditions.

The columns represent the means \pm standard deviation.

except genotype BR5033 which showed a 14 % increase in leaves. The apparent increases in root soluble carbohydrates observed in BR5033 and CMS50 were not statistically significant. When root amino acids and root carbohydrates from salt stressed plants in both BR5011 and BR5033 genotypes were compared, it was observed that the latter had 132 % more amino acids and 122 % more carbohydrates than the former.

3.4. Plant growth, solute accumulation and predawn leaf water potential relationships: comparing leaf and root amino acid and carbohydrate contents with RGR and NAR of salt stressed plants, it was observed that there was no statistically significant correlation between amino acids or carbohydrates in leaves with growth (data not shown). However, there were highly significant correlations between soluble organic solutes in the roots and these growth parameters (figure 2.3). When analyzing the different genotypes it was observed that genotype BR5011 always had the lowest values of RGR and NAR. It also accumulated the least amount of soluble organic solutes in the roots. In contrast, genotype BR5033 accumulated the highest amount of soluble organic solutes and its RGR and NAR were always close to maximal.

4. DISCUSSION

Plant growth (SDM, RDM, LA, RGR, and NAR) of all genotypes studied were inhibited by salt stress. Genotype BR5011 suffered the largest growth reduction while the smallest reduction was observed for genotype BR5033, suggesting that the former is the most salt-sensitive and the latter the most salt-tolerant (figure 2.1).

Although several authors have suggested that the reduction in SDM/RDM ratio due to water shortage should be an indicator of stress adaptation, and consequently a good morphophysiological marker for stress tolerance (Alberico and Cramer, 1993; Azevedo Neto and

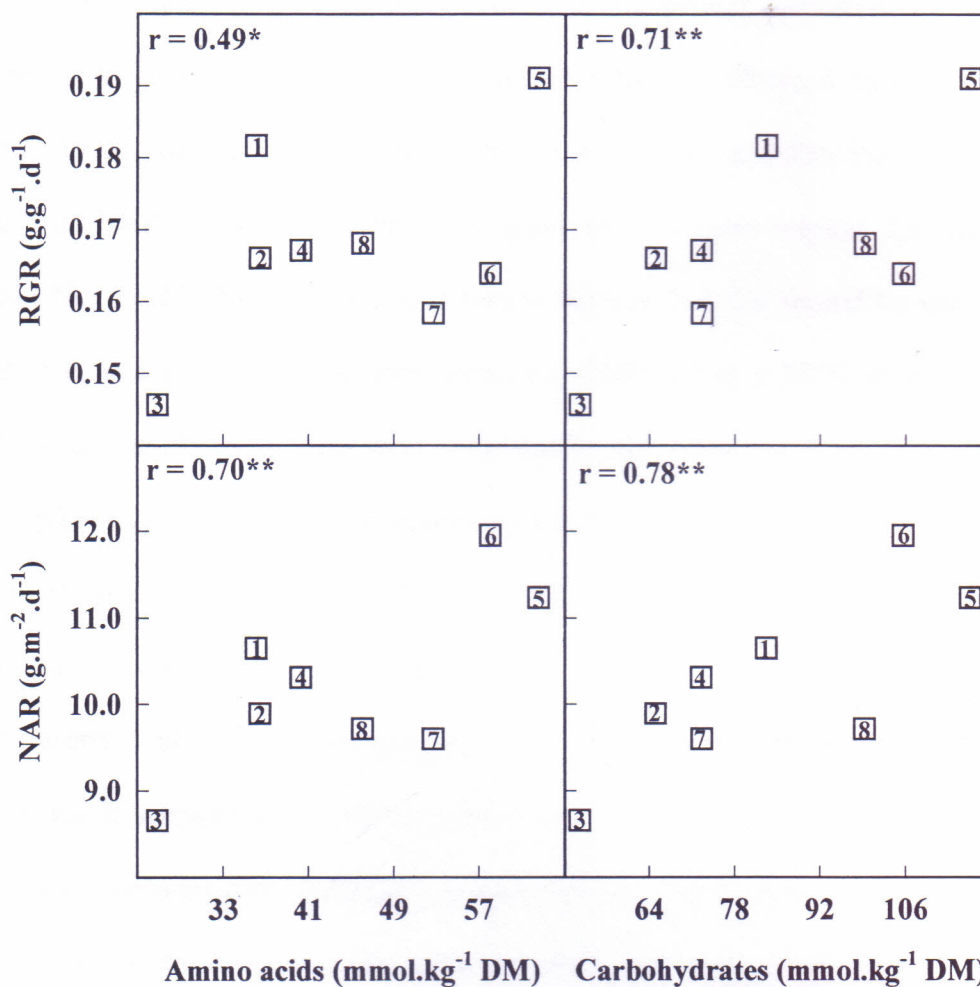


Figure 2.3. Correlation between soluble amino acids, and soluble carbohydrates in roots *versus* relative growth rate (RGR) and net assimilation rate (NAR) of eight maize genotypes grown in nutrient solution with added 100 mmol.L⁻¹ of NaCl. Genotypes BR3123, BR5004, BR5011, BR5026, BR5033, CMS50, D766, and ICI8447 are numbered from 1 to 8, under the same order, r – correlation coefficient, * = statistically significant (P<0.05), ** = statistically significant (P<0.01).

Tabosa, 2000a), our data do not support this idea because the genotypes BR5026 and D766, that were among the more salt-sensitive also showed significant decreases in SDM/RDM ratio.

There was a relation between NAR reduction and growth inhibition for most of the genotypes as a result of salt stress. Similar results were also obtained by others (Erdei and Taleisnik, 1993; Alarcon et al., 1994; Wahid et al., 1999), and this led some authors to suggest that NAR reduction should be a good physiological marker for salt tolerance (Azevedo Neto and Tabosa, 2000a). Our results suggest that this should be used with care. For instance, under control conditions, genotype CMS50 had a NAR identical to that of BR5033, and when both of them were subjected to salt stress the NAR of the former was slightly higher than that of the latter, suggesting that CMS50 should be more salt-tolerant than BR5033. However, their SDM, RDM, LA, and RGR showed exactly the contrary, i.e. BR5033 was more salt-tolerant than CMS50.

The transpiration and leaf water potential results suggest that the water balance of BR5033 genotype was better adapted to salt stress than that of all other genotypes. It is well known that salt stress reduces root hydraulic conductivity resulting in decreased water flow from roots to shoot, even in osmotically adjusted plants (O'Leary, 1969; Prisco, 1980). This decrease in water flow due to salt stress may cause a lowering in leaf water content, that would result in stomatal closure in order to maintain their water status (Prisco, 1980; Robinson et al., 1997). Therefore, it could be hypothesized that the maintenance of g_s and Ψ_w in BR5033 was due to the fact that this genotype was much more resistant to a salt induced reduction in root hydraulic conductivity than the others, and as a result maintained its water status even under salt stress conditions.

The higher Na^+ content in roots than in leaves of salt stressed plants (figure 2.2) has also been observed for other maize genotypes (Alberico and Cramer, 1993; Erdei and Taleisnik,

1993; Azevedo Neto and Tabosa, 2000b). Based on leaf Na^+ and water contents it was estimated that the Na^+ concentrations in leaves of both BR5011 and BR5033 genotypes were 185 and 177 mmol.L^{-1} , respectively. These values are much higher than the cytosolic Na^+ concentration of 100 mmol.L^{-1} that is considered as the upper limit for cells adapted or not to salt stress (Binzel et al., 1988). Although the estimated values represent a mean of the Na^+ concentration in the vacuole and cytoplasm, they may suggest that both BR5011 and BR5033 genotypes compartmentalize ions within their leaf cells (Hajibagheri et al., 1987). Some authors (Alberico and Cramer, 1993) have suggested that salt tolerance in maize was not related to shoot Na^+ content but to the capacity of the cells to compartmentalize the ions in the vacuole, i.e. maintain a low Na^+ content in the cytoplasm. Therefore, it is possible that BR5033 was more salt-tolerant than BR5011 because it was more efficient in excluding Na^+ from leaf cell cytoplasm.

The reduction in potassium content in both leaves and roots as result of salt stress (figure 2.2) has been observed previously, and it has been interpreted as resulting from competition between this ion and Na^+ (Hajibagheri et al., 1987; Alberico and Cramer, 1993; Azevedo Neto and Tabosa, 2000b). The differences in leaf K^+ content could not explain the differences in salt tolerance between all genotypes. However, the higher reduction in root K^+ content of the most salt-sensitive genotype suggests that salt induced shoot growth inhibition is mainly due to metabolic changes resulting from ion imbalance or ion toxicity occurring in root system (Prisco, 1980; Munns, 2002).

Soluble amino acids and carbohydrates are considered to be the main organic solutes involved in osmotic adjustment (Ullah et al., 1993; Saneoka et al., 1995; Lacerda et al., 2001). Contrary to the situation in leaves, root soluble organic solutes from stressed plants were highly correlated with RGR and NAR (figure 2.3). The analysis of the correlations between

root organic solutes *versus* RGR and NAR showed that as the root organic solute contents increase the plants tend to be more salt-tolerant.

Under salt stress, the salt-sensitive genotype showed the lowest root Na^+ content, which could be explained by the lower capacity of the plants to retain sodium in their root cells when they were grown under such conditions (Greenway and Munns, 1980; Boursier and Lauchli, 1990). In addition, the salt-induced depletion of the root soluble organic solute contents in this genotype may be due to the inhibition of net photosynthesis (figure 2.1), reducing the amount of carbon fixed in the shoot and transported to the roots (Richardson and McCree, 1985). At the same time, the salt-induced soluble organic solute accumulation in roots of the most salt-tolerant genotype (BR5033) may have helped the maintenance of water absorption by the roots and its flux to the shoot. This would also help to conserve its Ψ_w (table 2.1) and to maintain its net photosynthetic rate and growth at a relatively high level when plants were grown under salt stress conditions. The higher salt-tolerance of BR5033 may also be associated to other factors, such as lower metabolic (energetic) cost spent with osmoregulation and/or an adequate compartmentalization of inorganic solutes in the vacuoles and of organic solutes in the cytosol (Hajibagheri et al., 1987; Sanchez et al., 1998).

The results obtained showed that of all genotypes studied, BR5033 was the most salt-tolerant and BR5011 the most salt-sensitive. They also showed that SDM/RDM ratios, leaf Na^+ content or leaf soluble organic solute content had no relation with salt tolerance, i.e., they could not be considered as good morpho-physiological markers for salt tolerance. In contrast, sodium and soluble organic solute accumulation in the roots as a result of salt stress appeared to play an important role in the acclimation of these genotypes to salt stress, suggesting that they could be used as physiological markers during the screening for salt tolerance.

Acknowledgements: to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

5. REFERENCES

- Alarcón JJ, Sanchez-Blanco MJ, Bolarin MC, Torrecillas A (1994) Growth and osmotic adjustment of two tomato cultivars during and after saline stress. *Plant Soil* 6:75-82.
- Alberico GL, Cramer GR (1993) Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? I. Preliminary screening of seven cultivars. *J. Plant Nutr.* 16:2289-2303.
- Azevedo Neto AD, Tabosa JN (1999) Evaluation of salt tolerance in seedlings of maize cultivars. *Pesq. Agrop. Pernamb.* 11:17-21.
- Azevedo Neto AD, Tabosa JN (2000a) Salt stress in maize seedlings: I. Growth analysis. *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.* 4:159-164.
- Azevedo Neto AD, Tabosa JN (2000b) Salt stress in maize seedlings: II. Distribution of cationic macronutrients and its relation with sodium. *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.* 4:165-171.
- Benincasa MMP (1988) Análise de crescimento de plantas (noções básicas). FUNEP, Jaboticabal.
- Binzel ML, Hess FD, Bressan RA, Hasegawa PM (1988) Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86:607-614.
- Bohnert HJ, Shen B (1999) Transformation and compatible solutes. *Sci. Hortic.* 78:237-260.
- Boursier P, Läuchli A (1990) Growth responses and mineral nutrient relations of salt-stressed sorghum. *Crop Sci.* 30:1226-1233.

- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, pp.1158-1203. ASPP, Rockville.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Erdei L, Taleisnik E (1993) Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. *Physiol. Plant.* 89:381-387.
- FAO (2000) Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Available in: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>.
- Gilbert GA, Gadush MV, Wilson C, Madore MA (1998) Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. *J. Exp. Bot.* 49:107-114.
- Greenway H, Munns R (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 31:149-190.
- Hajibagheri MA, Harvey DMR, Flowers TJ (1987) Quantitative ion distribution within root cells of salt-sensitive and salt-tolerant maize varieties. *New Phytol.* 105:367-379.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 51:463-499.
- Lacerda CF, Cambraia J, Cano MAO, Ruiz HA (2001) Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 13:270-284.
- Lira MA, Paris MA, Mafra RC (1982) Soil fertility and fertilizer use research intercropping systems in northeast of Brazil. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife.
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 28:239-250.

- O'Leary JW (1969) The effect of salinity on the permeability of roots to water. *Israel J. Bot.* 18:1-9.
- Prisco JT (1980) Alguns aspectos da fisiologia do "stress" salino. *Rev. Bras. Bot.* 3:85-94.
- Richardson SG, McCree KJ (1985) Carbon balance and water relations of sorghum exposed to salt and water stress. *Plant Physiol.* 79:1015-1020.
- Robinson MF, Véry A-A, Sanders D, Mansfield TA (1997) How can stomata contribute to salt tolerance? *Ann. Bot.* 80:387-393.
- Sánchez FJ, Manzanares M, Andres EF, Tenorio JL, Ayerbe L (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Res.* 59:225-235.
- Saneoka H, Nagasaka C, Hahn DT, Yang WJ, Premachandra GS, Joly RJ, Rhodes D (1995) Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiol.* 107:631-638.
- Sarruge JRS, Haag HP (1974) *Análises químicas em plantas.* USP-ESALQ, Piracicaba.
- Serraj R, Sinclair TR (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25:333-341.
- Snedecor GW (1956) *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology.* The Iowa State College Press, Ames.
- Ullah SM, Soja G, Gerzabek MH (1993) Ion uptake, osmoregulation and plant-water relations in faba beans (*Vicia faba*, L.) under salt stress. *Die Bodenkultur* 44:291-301.
- Wahid A, Masood I, Javet I-H, Rasul E (1999) Phenotypic flexibility as marker of sodium chloride tolerance in sunflower genotypes. *Environ. Exp. Bot.* 42:85-94.
- Yemm EW, Cocking EC (1955) The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst* 80:209-213.

CAPÍTULO 3

Acúmulo de solutos orgânicos e fracionamento de aminoácidos livres em folhas e raízes de dois genótipos de milho sob estresse salino

(Trabalho a ser enviado para publicação)

1. Introdução

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos

2.2. Preparo do extrato

2.3. Análise dos teores de carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e proteínas solúveis

2.4. Derivatização dos aminoácidos

2.5. Análise de aminoácidos livres

2.6. Análise estatística

3. Resultados

3.1. Carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e proteínas solúveis

3.2. Aminoácidos livres

4. Discussão

5. Referências

Acúmulo de solutos orgânicos e fracionamento de aminoácidos livres em folhas e raízes de dois genótipos de milho sob estresse salino

1. Introdução

Os efeitos da salinidade sobre as plantas têm sido foco de pesquisas nos últimos 100 anos, devido o estresse salino ser um dos principais fatores que limitam o crescimento e a produtividade das culturas. A tolerância à salinidade é um fenômeno complexo, que pode envolver alterações desenvolvimentais e morfológicas, bem como processos fisiológicos e bioquímicos (Delauney & Verma, 1993; Hare & Cress, 1997).

Embora os mecanismos de tolerância à salinidade ainda não estejam bem conhecidos (Hasegawa et al., 2000), o acúmulo de íons inorgânicos e a síntese e acúmulo de compostos orgânicos de baixa massa molecular, também chamados solutos compatíveis, têm sido considerados mecanismos ubíquos para o ajustamento osmótico celular (Strange, 2004). Entretanto, além de seu papel estritamente osmótico, alguns desses solutos podem auxiliar na estabilização das proteínas, complexos protéicos e membranas, bem como na manutenção das homeostases iônica e osmótica ou servirem como reserva de carbono e nitrogênio (Bohnert & Shen, 1999; Bray et al., 2000). Adicionalmente, podem contribuir no controle do pH citosólico e na desintoxicação do excesso de NH_4^+ (Gilbert et al., 1998; Mansour, 2000). Modelos atuais sugerem que pequenas quantidades de solutos compatíveis também podem proteger as plantas removendo radicais livres do oxigênio gerados pelo estresse oxidativo secundário (Smirnov & Cumbes, 1989; Zhu, 2002).

Entre os compostos orgânicos, os nitrogenados (aminoácidos e compostos de amônio quaternário) e os poliídrolícos (carboidratos e poliálcoois) são os solutos compatíveis mais comumente acumulados em plantas sob condições de estresse (Rabe, 1990; Ashraf & Harris, 2004). Neste contexto, o acúmulo de aminoácidos e carboidratos solúveis tem sido estudado

tanto em plantas sob condições de estresse hídrico (Thakur & Rai, 1982; Ranieri et al., 1989; Tan, et al., 1992; Büssis & Heineke, 1998) como de estresse salino (Rodríguez et al., 1997; Lacerda et al., 2003; Silva et al., 2003; Azevedo Neto et al., 2004;), visto que são os solutos orgânicos de maior contribuição para o potencial osmótico.

Dentre os compostos nitrogenados solúveis, a prolina tem sido o mais amplamente estudado, em contraste com outros compostos nitrogenados que também são acumulados em resposta aos estresses. Em adição, a maior parte destes estudos tem sido focada nos tecidos fotossintéticos e o padrão de acúmulo de solutos compatíveis na raiz, que usualmente é o primeiro órgão diretamente exposto ao estresse salino, não tem sido muito estudado.

Estudos fisiológicos e bioquímicos têm demonstrado que as vias de assimilação de C e N são reguladas reciprocamente (Champigny & Foyer, 1992) e que a habilidade das plantas para desviar o fluxo desses elementos da produção de biomassa para a biossíntese de solutos osmóticos é particularmente importante para a compreensão das respostas das plantas ao estresse salino (Binzel et al., 1985; Richardson & McCree, 1985). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da salinidade nos teores de carboidratos solúveis, proteínas solúveis e N-aminossolúveis, com ênfase na composição de aminoácidos, em folhas e raízes de dois genótipos de milho com tolerância diferenciada à salinidade, visando um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos com a tolerância à salinidade.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos

Sementes de dois genótipos de milho, sendo um tolerante (BR5033) e outro sensível (BR5011) ao estresse salino (Azevedo Neto et al., 2004), foram semeadas em bandejas contendo vermiculita e irrigadas diariamente com água destilada. Quatro dias após a

emergência, as plântulas foram transferidas para bandejas contendo solução nutritiva de Hoagland diluída 1:2, sob condições de aeração. Nove dias após, elas foram transferidas para vasos de polietileno contendo 3 L de solução nutritiva sem diluição (tratamento controle) ou solução nutritiva contendo NaCl a 100 mM (tratamento de estresse salino). As adições de sal (25 mM de NaCl por dia) iniciaram-se no momento da transferência para os vasos de polietileno. Foram realizadas seis coletas, sendo a primeira um dia antes do início das adições de sal (tempo 0) e as demais aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias após o início da salinização. Folhas e raízes de cinco plantas de cada tratamento foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, liofilizadas, trituradas e armazenadas a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e, durante o período experimental, as médias de temperatura e umidade relativa do ar foram, respectivamente, de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 65% e a radiação fotossinteticamente ativa ao meio dia foi cerca de $1200\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$.

2.2. Preparo do extrato

O extrato foi preparado pela homogeneização de 0,20 g do pó liofilizado de folhas ou 0,15 g de raízes em 4 mL de tampão de extração (tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0 contendo EDTA a 0,1 mM) em almofariz. O homogeneizado foi filtrado através de tecido de musselina, centrifugado a $16\ 000 \times g$ por 15 min e o sobrenadante foi usado como extrato bruto para as análises de N-aminossolúveis, carboidratos solúveis e proteínas solúveis. Uma alíquota de 0,5 mL deste extrato foi desproteïnizada adicionando-se 0,5 mL de TCA a 10% e centrifugando-se a mistura a $12\ 000 \times g$ por 5 min após 1 h de repouso. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para fracionamento e análise de aminoácidos livres.

2.3. *Análise dos teores de carboidratos solúveis, N-aminossolúveis, e proteínas solúveis*

Os carboidratos solúveis foram determinados a 490 nm, pelo método do fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956), utilizando-se D-(+)-glucose como padrão. A determinação de N-aminossolúveis foi realizada a 570 nm, pelo método da ninhidrina (Yemm & Cocking, 1955), utilizando-se glicina como padrão. As proteínas solúveis foram determinadas a 595 nm pelo método de ligação ao corante coomassie brilliant blue (Bradford, 1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

2.4. *Derivatização dos aminoácidos*

Uma alíquota de 100 μL do extrato bruto desproteínizado foi seca à vácuo, ressuspensa em 10 μL de uma solução contendo metanol:trietilamina:água (2:2:1 v/v) e novamente seca. Os aminoácidos foram convertidos em derivados feniltiocarbamil-aminoácidos pela adição de 20 μL de uma solução contendo metanol:trietilamina:água:fenilisotiocianato (PICT) na proporção 7:1:1:1 v/v. Após secagem à vácuo, as amostras foram ressuspensas com 100 μL de diluente Pico-Tag e transferidas para os respectivos frascos de injeção.

2.5. *Análise de aminoácidos livres*

A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), usando-se o método Pico-Tag. Uma alíquota de 10 μL da mistura de aminoácidos derivatizados foi injetada em uma coluna Pico-Tag modelo Waters 088131 (3,5 x 250 mm), para análise de aminoácidos livres, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio a 0,14 M, pH 6,2, contendo EDTA a 2,5 μM (solvente A). A amostra foi eluída a um fluxo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a 40°C, utilizando-se um gradiente de acetonitrila (solvente B) de 0 a 60%, conforme descrito no método Pico-Tag. Foi utilizado um sistema HPLC, Alliance System, modelo Waters 2690 (Milford, MA, USA) com detector de absorvância modelo Waters 486 e

software gerenciador de cromatografia Millenium 32. Os derivados feniltiocarbamil-aminoácidos foram monitorados a 254 nm e quantificados por comparação com as curvas de calibração dos padrões correspondentes, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de matéria seca (MS).

2.6. Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial seis (tempos) \times dois (cultivares) \times dois (níveis de sal), com cinco repetições. Cada repetição foi representada por um extrato simples dosado em duplicata. Os dados foram comparados através de suas médias e respectivos desvios padrões.

3. Resultados

3.1. Carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e proteínas solúveis

As variações nos teores de carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e proteínas solúveis em folhas e raízes são apresentadas na Figura 3.1. Nas folhas do genótipo tolerante (BR5033), o teor de carboidratos solúveis foi pouco afetado pela salinidade (correspondendo em média a 106% do controle) ao longo do período experimental (Fig. 3.1A). Em contraste, no genótipo sensível (BR5011), o conteúdo de carboidratos solúveis diminuiu aos 10 dias do início das adições de NaCl, chegando a 30% de redução em relação aos 25 dias. Nas raízes, foi observado um padrão similar ao das folhas (Fig. 3.1B) O teor de carboidratos solúveis permaneceu relativamente constante no genótipo BR5033 (representando, em média, 89% do controle) e diminuiu 34% no BR5011 no fim do experimento.

A salinidade aumentou os teores de N-aminossolúveis nas folhas do BR5033 a partir do dia 10, os quais permaneceram relativamente constantes, com um valor médio igual a 38% acima do controle, até o final do experimento (Fig. 3.1C). Nas folhas do BR5011, a

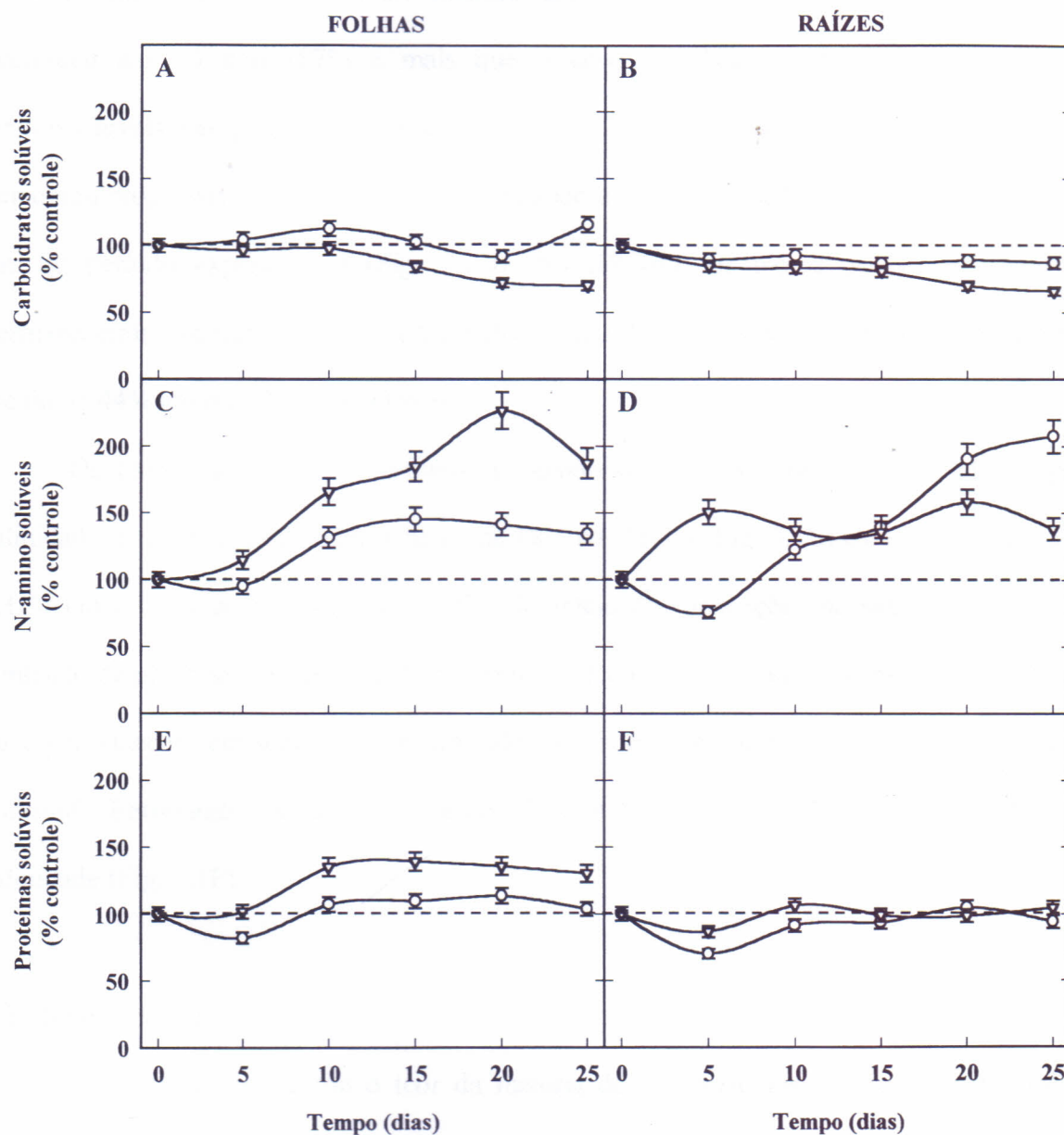


Figura 3.1. Conteúdo de carboidratos solúveis (A e B), compostos N-aminossolúveis (C e D) e proteínas solúveis (E e F) nas folhas e raízes de dois genótipos de milho, BR5033 (○) e BR5011(▽), cultivados em condições controle e de estresse salino. Os dados são expressos em porcentagem do controle (-----). O tempo representa os dias após o início das adições de sal. A barras verticais representam os desvios padrões.

concentração de N-aminossolúveis aumentou 66% em relação ao controle, aos 10 dias do início da salinização, alcançou um máximo aos 20 dias (127% maior que o controle) e decresceu aos 25 dias (87% a mais que o controle). Nas raízes, o conteúdo de N-aminossolúveis nas plantas estressadas do BR5033 foi reduzido em 24% no dia 5, mas aumentou progressivamente em seguida, chegando a um valor 108% maior que o controle no fim do período experimental (Fig. 3.1D). No BR5011, os teores de N-aminossolúveis permaneceram praticamente constantes entre os dias 10 e 25, sendo observado um aumento médio de 44% em relação aos controles.

Os teores de proteínas solúveis no genótipo BR5033 foram pouco afetados pela salinidade, com exceção de uma redução de 18% nas folhas (Fig. 3.1E) e de 30% raízes (Fig. 3.1F), em relação ao controle, aos 5 dias do início das aplicações de sal. No BR5011, o conteúdo de proteínas solúveis nas folhas (Fig. 3.1E) aumentou com o estresse a partir do dia 10 e permaneceu, em seguida, com um valor relativamente constante (em média, 135% do controle). Entretanto nas raízes, os teores de proteínas solúveis não foram afetados pela salinidade (Fig. 3.1F).

3.2. Aminoácidos livres

A salinidade aumentou o teor da maioria dos aminoácidos livres, tanto nas folhas (Figs. 3.2 a 3.4) como nas raízes (Figs. 3.5 a 3.7) de ambos os genótipos. Entretanto, a magnitude deste aumento variou entre os órgãos das plantas. Considerando a média das duas últimas coletas (dias 20 e 25), os aminoácidos cujos teores aumentaram com o estresse nas folhas dos genótipos BR5033 e BR5011 foram, respectivamente, alanina (253 e 168%), serina (100 e 458%), glicina (99 e 179%), histidina (60 e 122%), prolina (41 e 87%), aspartato (55 e 72%), tirosina (49 e 39%) e metionina (36 e 147%) (Figs. 3.2 a 3.4). Neste mesmo período,

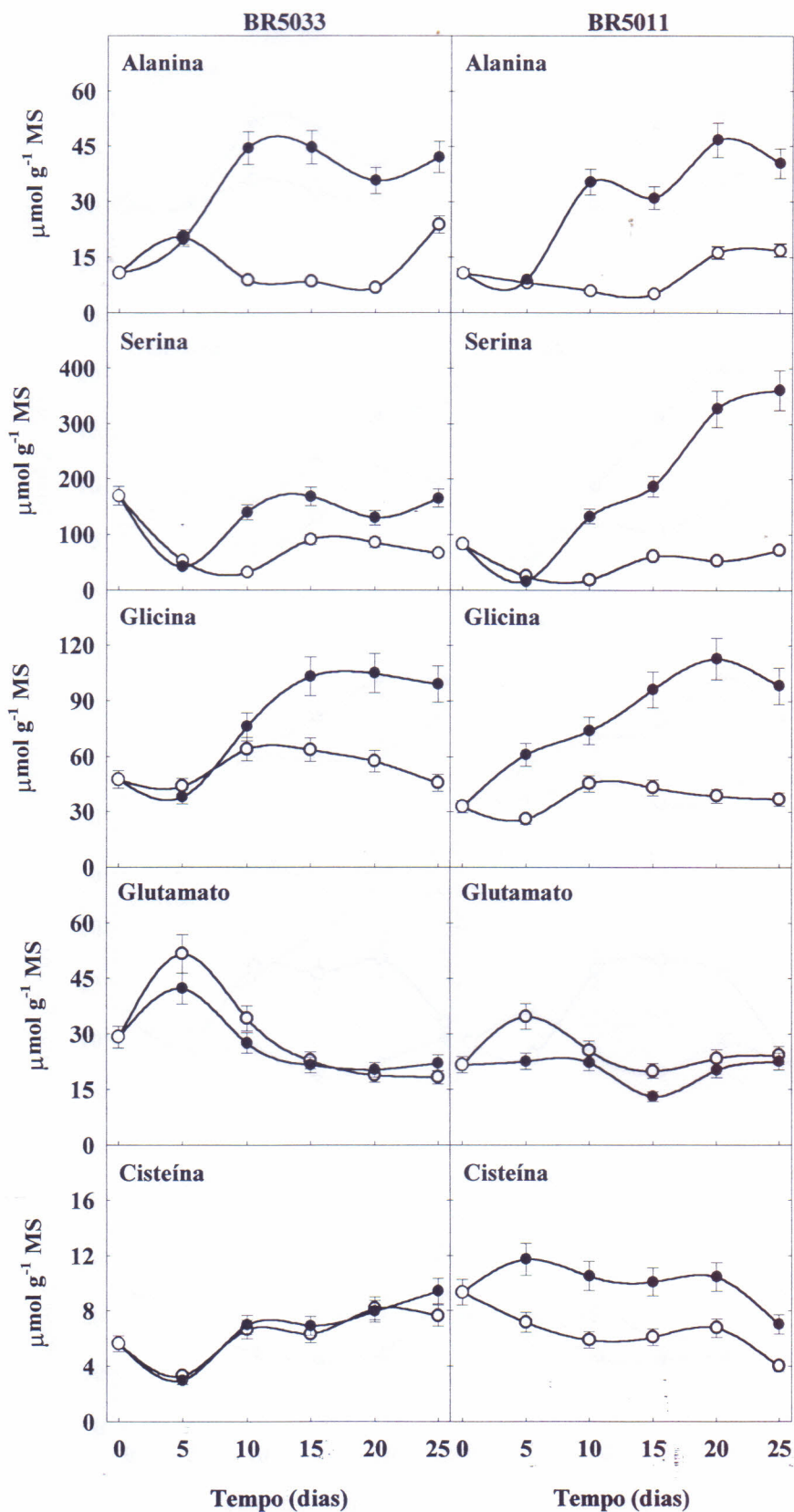


Figura 3.2. Teores de alanina, serina, glicina, glutamato e cisteína nas folhas de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle (símbolos vazios) e de estresse salino (símbolos cheios). Detalhes adicionais como na Figura 3.1.

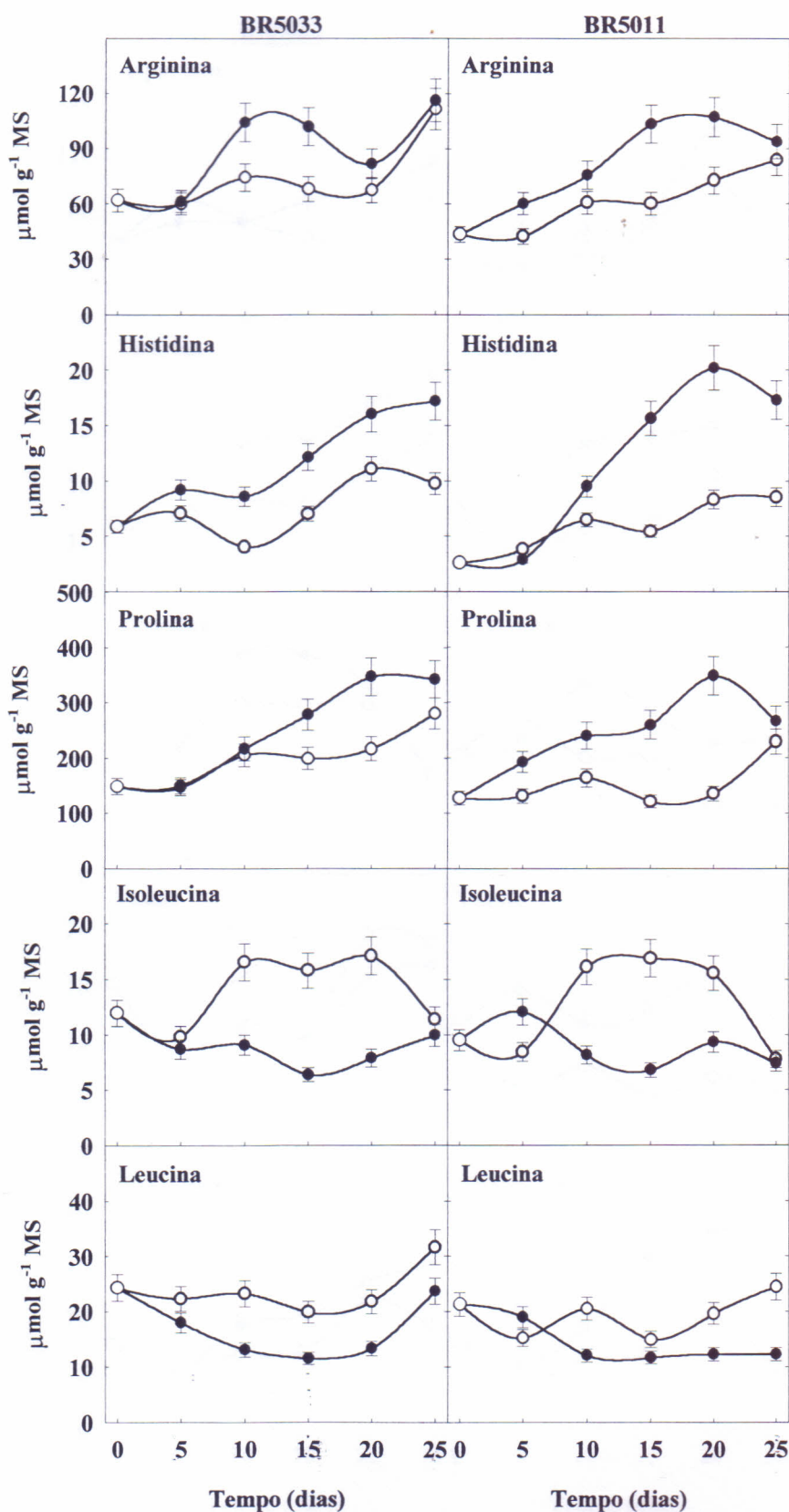


Figura 3.3. Teores de arginina, histidina, prolina, isoleucina e leucina nas folhas de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle (símbolos vazios) e de estresse salino (símbolos cheios). Detalhes adicionais como na Figura 3.1.

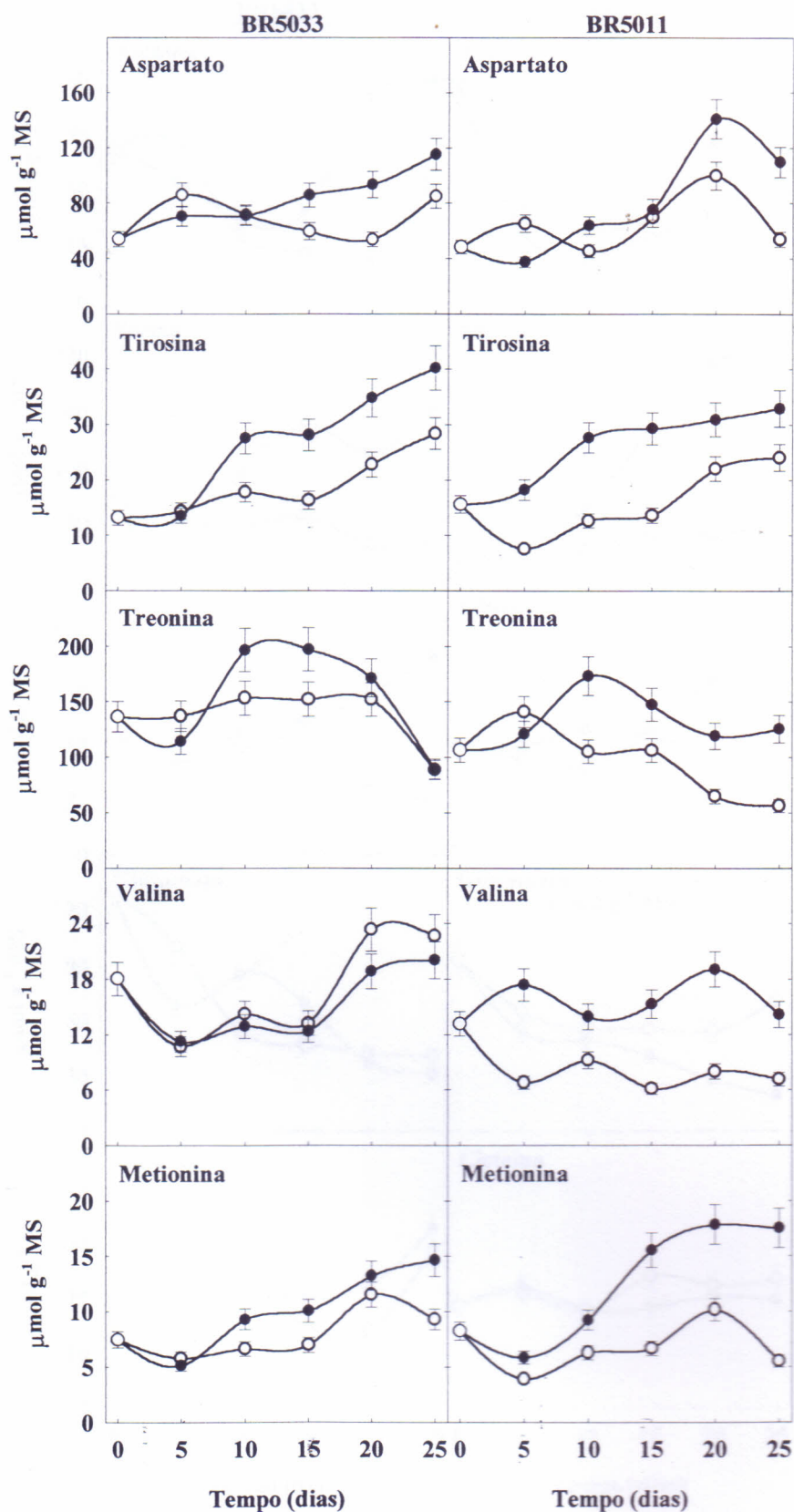


Figura 3.4. Teores de aspartato, tirosina, treonina, valina e metionina nas folhas de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle (símbolos vazios) e de estresse salino (símbolos cheios). Detalhes adicionais como na Figura 3.1.

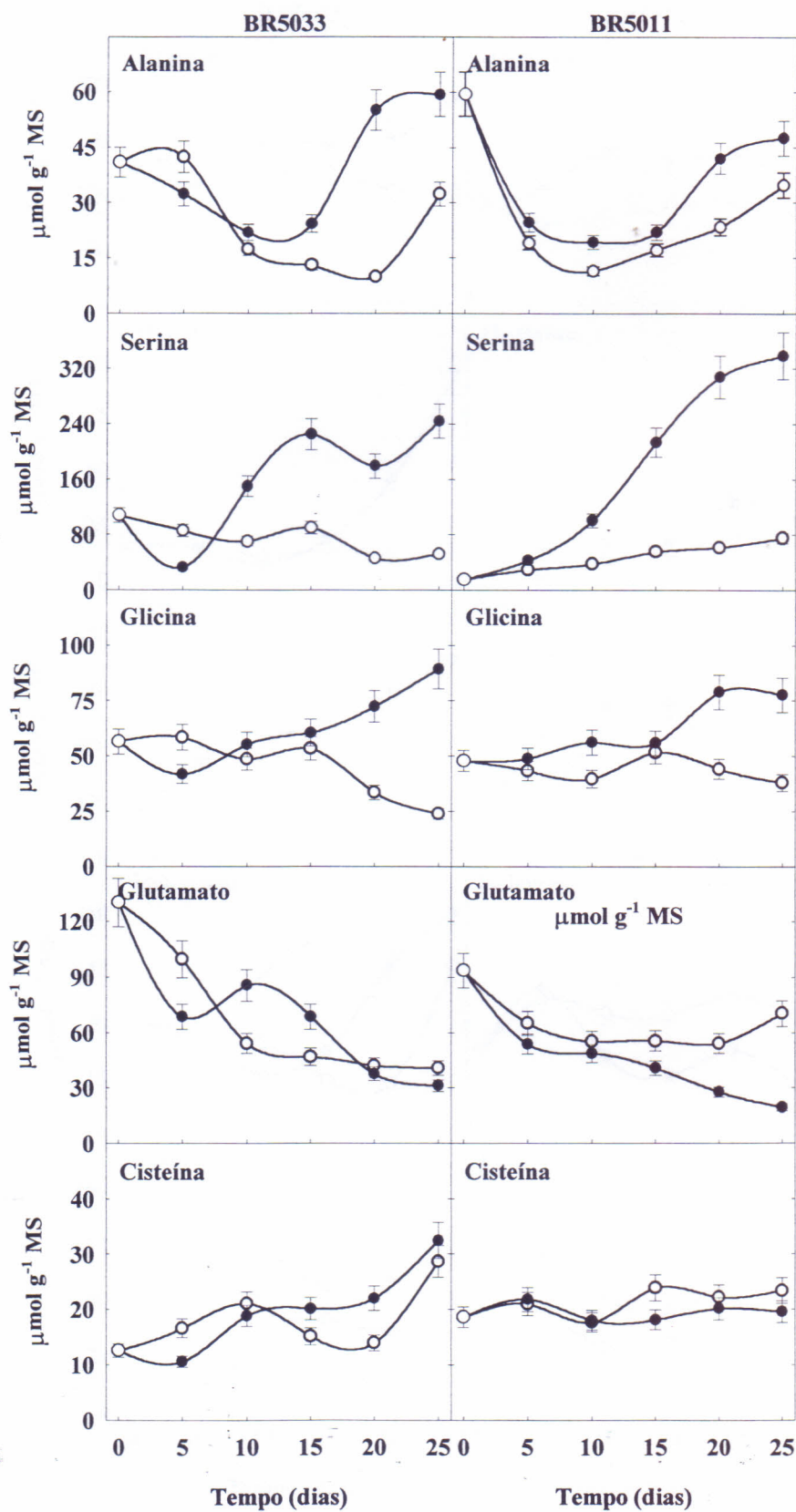


Figura 3.5. Teores de alanina, serina, glicina, glutamato e cisteína nas raízes de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle (símbolos vazios) e de estresse salino (símbolos cheios). Detalhes adicionais como na Figura 3.1.

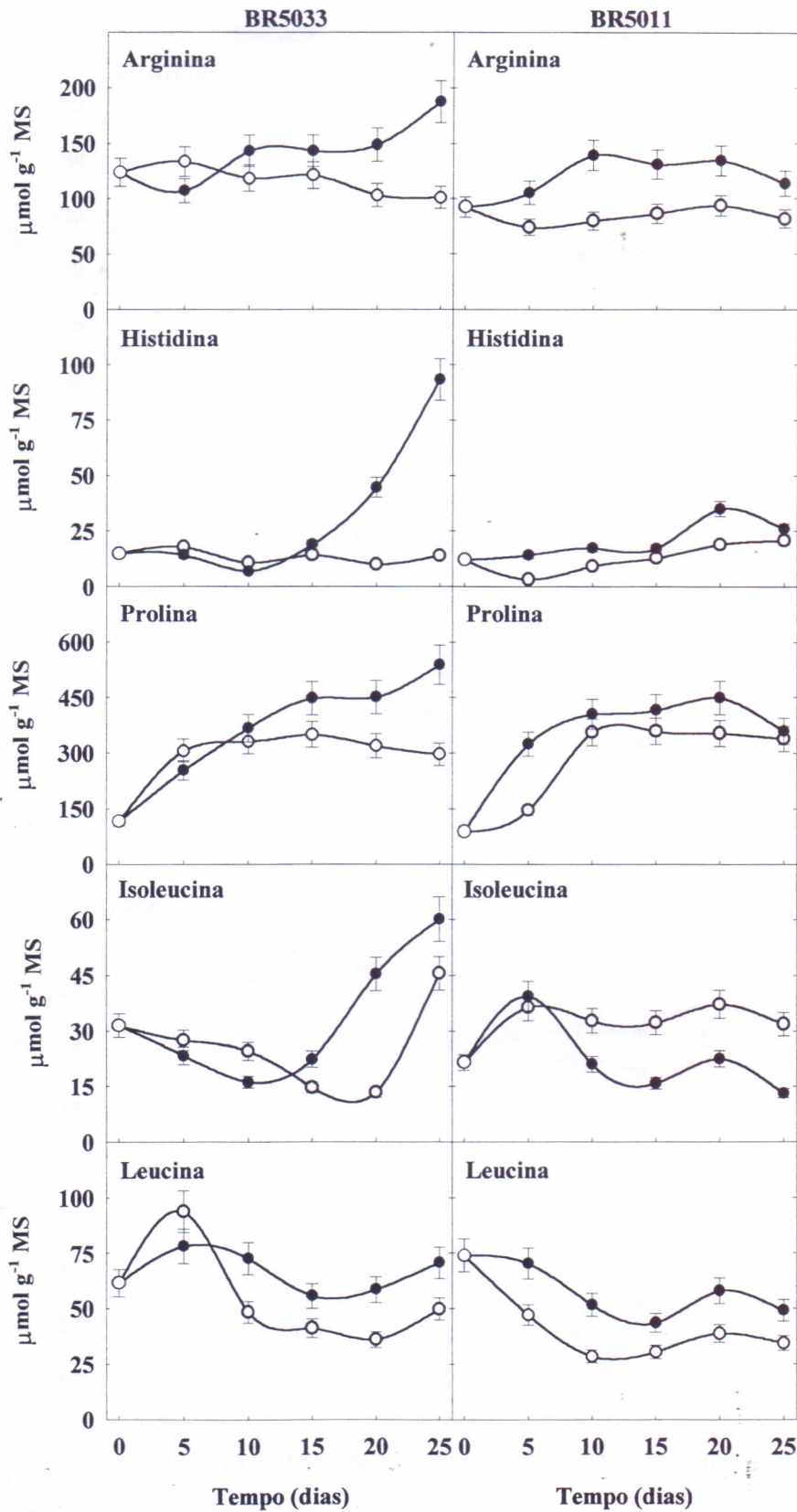


Figura 3.6. Teores de arginina, histidina, prolina, isoleucina e leucina nas raízes de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle (símbolos vazios) e de estresse salino (símbolos cheios). Detalhes adicionais como na Figura 3.1.

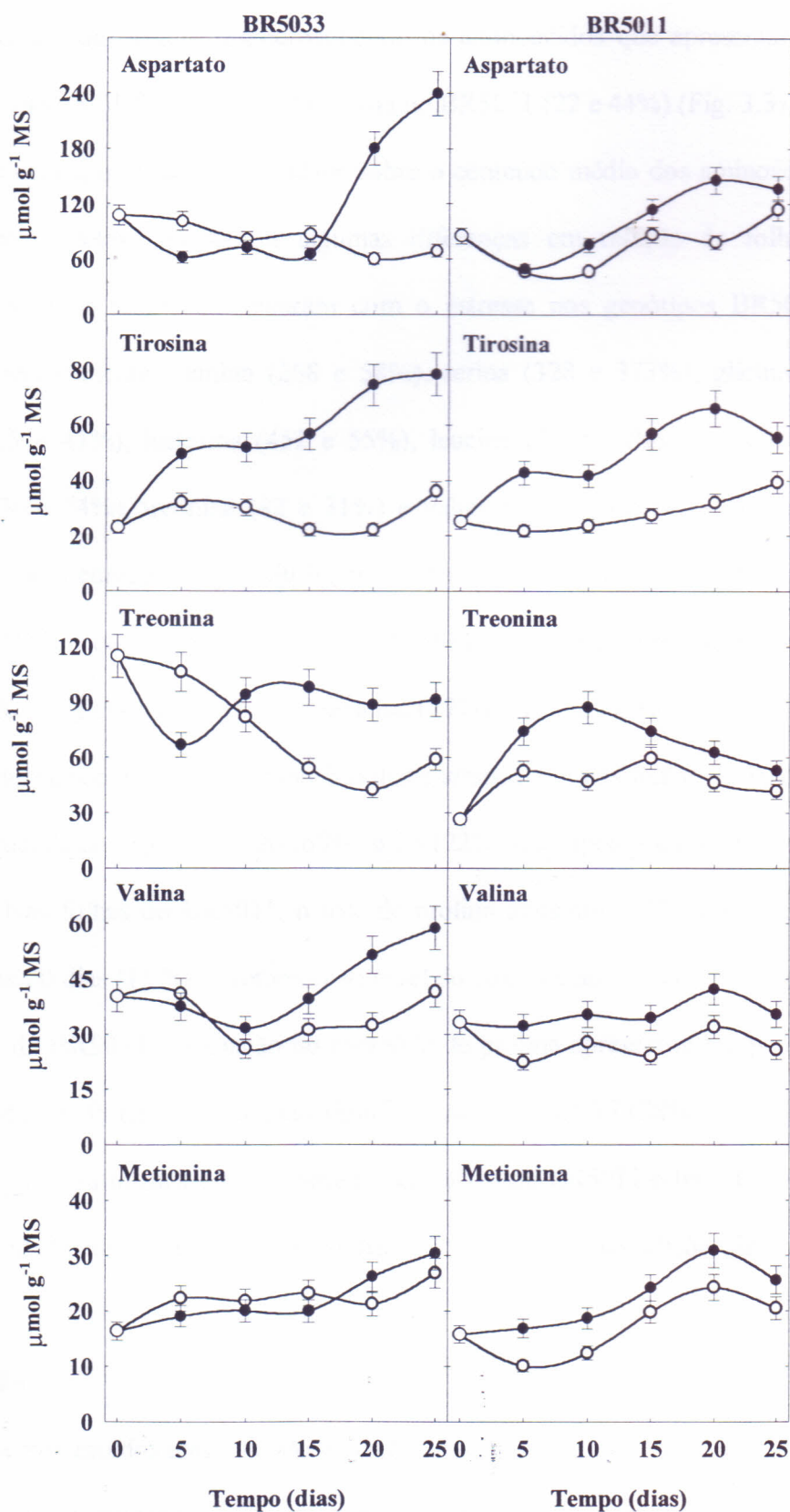


Figura 3.7. Teores de aspartato, tirosina, treonina, valina e metionina nas raízes de dois genótipos de milho, BR5033 e BR5011, cultivados em condições controle (símbolos vazios) e de estresse salino (símbolos cheios). Detalhes adicionais como na Figura 3.1.

leucina e isoleucina foram, respectivamente, os aminoácidos que apresentaram as maiores reduções, tanto no BR5033 (33 e 32%) como no BR5011 (22 e 44%) (Fig. 3.3).

Nas raízes, o efeito da salinidade sobre o conteúdo médio dos aminoácidos livres nas duas últimas coletas, apresentou algumas diferenças em relação às folhas. Assim, os aminoácidos cujos teores aumentaram com o estresse nos genótipos BR5033 e BR5011 foram, respectivamente, alanina (268 e 58%), serina (328 e 373%), glicina (196 e 91%), arginina (65 e 41%), histidina (452 e 55%), leucina (53 e 46%), aspartato (223 e 53%), tirosina (176 e 74%), treonina (82 e 31%) e valina (50 e 35%) (Figs. 3.5 a 3.7). O único aminoácido cujo conteúdo diminuiu ligeiramente com o estresse nas raízes do BR5033 foi o glutamato (17%), enquanto nas raízes do BR5011 os aminoácidos que tiveram seus teores reduzidos foram glutamato (61%) e isoleucina (49%) (Figs. 3.5 e 3.6).

Com relação à prolina, o conteúdo deste aminoácido nas folhas do BR5033 aumentou com a salinidade aos 15 (40%), 20 (60%) e 25 (22%) dias após o início do tratamento salino (Fig. 3.3). Nas folhas do BR5011, o teor de prolina aumentou 46%, aos 5 dias, atingiu um máximo aos 20 dias (157%) e retornou ao nível do controle aos 25 dias. Nas raízes das plantas estressadas do BR5033, a variação no conteúdo de prolina apresentou um padrão semelhante ao observado nas folhas, aumentando significativamente aos 15 (28%), 20 (41%) e 25 (81%) dias do início da salinização. Em contraste, nas raízes do BR5011 o teor de prolina aumentou com a salinidade aos 5 dias (121%) e 20 dias (27%) do início das adições de sal (Fig. 3.6).

4. Discussão

Diversos estudos têm relatado variações nos teores de carboidratos solúveis em plantas sob condições de estresse e mostram que a salinidade pode aumentar o teor desses solutos orgânicos em algumas plantas (Lacerda et al., 2003; Silva et al., 2003) ou diminuir em outras (Gadallah, 1999; Agastian et al., 2000). Em cultivares de milho contrastantes, o conteúdo de

carboidratos solúveis em folhas e raízes permaneceu constante ou aumentou com a salinidade no genótipo tolerante mas diminuiu no sensível à salinidade (Azevedo Neto et al., 2004). Resultados semelhantes a estes foram observados neste trabalho e sugerem que a redução no conteúdo de carboidratos solúveis no genótipo sensível pode estar relacionada à inibição da fotossíntese líquida, reduzindo a quantidade de carbono fixado nas folhas e transportada para as raízes. Em adição, a redução nos níveis de carboidratos em condições de estresse pode diminuir a absorção de água pelas raízes e seu fluxo para a parte aérea, comprometendo o balanço hídrico deste genótipo e contribuindo para sua maior sensibilidade ao estresse salino.

O fato da salinidade ter aumentado os teores de compostos N-aminossolúveis nas folhas e raízes de ambos os genótipos sugere um importante papel desses solutos orgânicos no processo de ajustamento osmótico e/ou em outros mecanismos de proteção contra o estresse. Diversos trabalhos reportam o acúmulo de aminoácidos e outros compostos nitrogenados de baixa massa molecular em plantas sob estresse salino (para revisões ver Rabe, 1990; Mansour, 2000). Em plantas de milho, Azevedo Neto et al. (2004) verificaram que o estresse salino aumentou o conteúdo de N-aminossolúveis nas folhas dos oito genótipos estudados. Entretanto, apenas o genótipo tolerante ao estresse apresentou um aumento no teor destes compostos nas raízes, o que pode ter contribuído para o caráter de tolerância deste genótipo.

O aumento no teor de N-aminossolúveis é freqüentemente atribuído à hidrólise (Roy-Macauley et al., 1992) ou à inibição da síntese protéica (Dhindsa & Cleland, 1975). Considerando que o conteúdo de proteínas solúveis nas folhas e nas raízes de ambos os genótipos não diminuiu com o estresse, o acúmulo de N-aminossolúveis, principalmente nas folhas do genótipo sensível pode ser resultado de outros fatores, tais como uma redução na exportação de aminoácidos e amidas (Tully et al., 1979) ou ser consequência de um bloqueio da respiração oxidativa, causando um fluxo de ácidos orgânicos para o *pool* de aminoácidos foliares (Olmos & Hellin, 1996).

O fato da salinidade ter aumentado o teor de proteínas solúveis apenas nas folhas do genótipo BR5011 sugere que isto pode ter ocorrido em função dos níveis mais elevados de N-aminossolúveis observado nas folhas deste genótipo. Alguns trabalhos mostram que, sob condições de salinidade, os cultivares mais tolerantes apresentam conteúdo de proteínas solúveis mais elevado do que cultivares sensíveis (Hurkman et al., 1989; Uma et al., 1995; Lutts et al., 1996; Pareek et al., 1997). Por outro lado, Ashraf & O'Leary (1999) mostraram que o aumento no conteúdo de proteínas solúveis devido ao estresse salino foi mais evidente no cultivar sensível do que no tolerante.

Embora a síntese de proteínas geralmente diminua sob condições de estresse, as células sintetizam, preferencialmente, proteínas específicas do estresse. Diversas proteínas induzidas pelo estresse salino em várias espécies vegetais têm sido identificadas e classificadas em dois grupos distintos: as proteínas do estresse salino, que são acumuladas devido exclusivamente ao estresse salino e as proteínas associadas ao estresse, que são acumuladas em resposta a diferentes estresses bióticos e abióticos (Singh et al., 1985; Singh et al., 1987b; Hurkman et al., 1989; Ramagopal & Carr, 1991; Ali et al., 1999; Mansour, 2000). Estas proteínas podem ser sintetizadas *de novo* em resposta ao estresse salino ou podem estar presentes, constitutivamente, em baixas concentrações e aumentarem quando as plantas são expostas à salinidade (Pareek et al., 1997). As proteínas que se acumulam nas plantas submetidas ao estresse salino podem representar uma forma de armazenamento de nitrogênio que pode ser reutilizada após a redução ou remoção do estresse (Singh et al., 1987a). Adicionalmente, estas proteínas também podem estar envolvidas no ajustamento osmótico (Mansour, 2000; Ashraf & Harris, 2004).

A resposta dos aminoácidos livres à salinidade foi diferenciada entre os genótipos estudados e mostrou-se dependente do órgão e do tempo de estresse. Contudo, paralelo aos resultados de N-aminossolúveis, verificou-se que o estresse aumentou os teores de

aminoácidos livres em ambos os genótipos, sendo este aumento mais evidente nas folhas do BR5011. Tais resultados reforçam a hipótese da ocorrência de perturbações no processo de translocação de compostos nitrogenados da parte aérea para as raízes no BR5011 (Tully et al., 1979; Larsson, 1992).

A glicina é produzida pela transaminação entre glutamato e glioxalato através da enzima glutamato: glioxalato aminotransferase e é o substrato para o complexo glicina descarboxilase: serina hidroximetiltransferase, que por sua vez produz serina, amônia, CO₂ e ATP. Os grandes aumentos nos teores foliares de glicina e serina, em função do tempo e do estresse, principalmente no BR5011, sugerem um aumento na taxa de fotorrespiração já que ambos os aminoácidos estão envolvidos com esse processo (Mifflin & Lea, 1977). Diversos trabalhos têm demonstrado a ocorrência de uma taxa significativa de fotorrespiração em plantas C₄, entre elas o milho, sob condições de baixa concentração intracelular de CO₂ e alta concentração de O₂ (Lawlor & Fock, 1978; Furbank & Badger, 1982; Farineu et al., 1984; de Veau & Burris, 1989; Dai et al., 1993). O estresse salino associado a alta intensidade luminosa e temperatura elevada pode levar à uma diminuição na relação [CO₂]/[O₂] no tecido fotossintético (Lawlor & Fock, 1978; Dai et al., 1993; Yoshimura et al., 2004), devido ao fechamento dos estômatos (Sultana et al., 1999; Silva et al., 2003; Azevedo Neto et al., 2004).

O aumento do conteúdo de alanina em plantas cultivadas em ambiente salino também tem sido observado por outros autores (Pulich Jr., 1986; Fougère et al., 1991; Gilbert et al., 1998; Shintinawy & El-Shourbagy, 2001;). A síntese da alanina é catalisada pela enzima glutamato: piruvato aminotransferase, na reação de transaminação entre glutamato e piruvato (Mifflin & Lea, 1977). Rhodes et al. (1986) mostraram que a síntese deste aminoácido representa o principal destino metabólico do glutamato. Mais de 30% do glutamato disponível para a biossíntese de aminoácidos (outros que não a glutamina) são utilizados para a manter a síntese de alanina em células não adaptadas ao estresse, enquanto mais de 55%, são utilizados

para manter a síntese em células adaptadas. Em espinafre, o aumento no conteúdo de alanina sugere que a glicólise e, deste modo, também a respiração, foram aumentadas para manter a alta demanda energética resultante das condições de estresse ou para fornecer esqueletos de carbono para o ciclo fotorrespiratório (Di Martino et al., 2003). Os aumentos nos conteúdos de alanina, serina e glicina associados ao fato que os teores de glutamato em ambos os genótipos não aumentaram com a salinidade, suportam a idéia do aumento da demanda de glutamato para as reações de transaminação após a imposição do estresse.

Também é importante lembrar que as variações nos conteúdos de glutamato e glicina estão diretamente associadas à síntese de cisteína (El-Shintinawy & El-Shourbagy, 2001). Estes três aminoácidos são precursores da glutathione, uma molécula importante para o sistema antioxidativo (Noctor & Foyer, 1998). Considerando que os aumentos nos conteúdos de glicina e cisteína podem ser resultantes de um decréscimo na síntese de glutathione e que, os conteúdos destes aminoácidos foram maiores nas plantas estressadas do genótipo BR5011 do que no BR5033, os resultados sugerem que este último genótipo pode ser mais tolerante aos danos oxidativos induzidos pelo sal.

O aumento nos teores de arginina em função da salinidade nos dois genótipos, tanto nas folhas como nas raízes, foi concordante com os observados por outros autores (Mattioni et al., 1997; Santa-Cruz et al., 1998; Santa-Cruz et al., 1999). Tem sido sugerido que o acúmulo de arginina em plantas sob deficiência de fósforo resulta da síntese *de novo*, a qual serve para desintoxicar o acúmulo de amônia em períodos de crescimento reduzido (Rabe & Lovatt, 1984). Tal explicação pode ser extensiva à histidina, que também aumentou com o estresse e que, da mesma forma que a arginina, está relacionada com o armazenamento de nitrogênio (Rabe, 1990). É importante ressaltar que aumentos nos níveis de amônia também têm sido verificados em plantas cultivadas em ambiente salino (Bajji et al., 1998; Lutts et al., 1999). Dessa forma, Gilbert et al. (1998) sugeriram que a síntese de compostos nitrogenados

contendo pelo menos dois grupos amino pode ser estimulada em resposta ao estresse salino e que estes compostos podem servir como importantes fontes de nitrogênio para as vias metabólicas. Considerando que a salinidade reduziu o crescimento das plantas (Azevedo Neto et al., 2004), os acúmulos de arginina e histidina observados neste trabalho podem, ao menos em parte, estar envolvidos, no processo de desintoxicação de amônia.

Nas folhas, os aminoácidos cujas concentrações mais diminuíram com a salinidade foram os produtos finais de duas famílias de aminoácidos: isoleucina (família do oxaloacetato) e leucina (família do piruvato). Treonina e piruvato são, respectivamente, os precursores das vias biossintéticas desses dois aminoácidos, que são reguladas por uma enzima comum, a sintase do acetolactato, a qual é inibida cooperativamente por leucina e valina (Mifflin & Lea, 1977). Considerando que o estresse salino aumentou a concentração de treonina e que o conteúdo de piruvato parece não ter sido limitante, a diminuição nos teores de isoleucina e leucina pode ser conseqüência de uma inibição na atividade da sintase do acetolactato pelo estresse salino, conforme foi especulado por El-Shintinawy & El-Shourbagy (2001). As variações nos teores destes aminoácidos também têm sido associadas às mudanças na síntese ou degradação de proteínas (Di Martino et al., 2003; Raggi, 1994). Dessa forma, as reduções verificadas nos teores de isoleucina e leucina podem indicar um aumento na síntese de proteínas. Pelo menos com relação ao BR5011, esta hipótese tem suporte, pois neste genótipo os teores de proteínas solúveis nas folhas aumentaram com a salinidade.

Com relação à prolina, o acúmulo deste aminoácido ocorre em resposta a diversos estresses bióticos e abióticos e é mediado, principalmente, pelo aumento na síntese e/ou inibição na oxidação deste aminoácido (Hare & Cress, 1997). Neste trabalho, os aumentos nos níveis de prolina em função do estresse salino foram relativamente pequenos, comparando-se aos observados com os outros aminoácidos. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de que o conteúdo do seu precursor, o glutamato, não ter aumentado nas folhas e ter

diminuído nas raízes. É importante lembrar que o glutamato é um substrato comum à biossíntese de vários aminoácidos (Mifflin & Lea, 1977). Portanto, enzimas de diferentes vias biossintéticas podem estar competindo por este aminoácido e, dessa forma, o acúmulo de um determinado aminoácido pode depender, ao menos em parte, de um delicado equilíbrio entre as atividades enzimáticas e a disponibilidade de substrato (Vance & Zaerr, 1990).

Tem sido sugerido que o acúmulo de prolina em resposta à salinidade está associado a distúrbios no conteúdo hídrico, comparável com o que é observado em condições de seca (Lacerda et al., 2003; Silva et al., 2003). Embora esta seja uma explicação plausível para condições de salinidade e extremos de temperatura, ela não explica, contudo, o rápido acúmulo de prolina em condições estressantes que não afetam, a curto prazo, o conteúdo hídrico dos tecidos, tais como, infecções por patógenos, anoxia e deficiências nutricionais Rabe (1990). Uma relação mais geral entre os estresses é o fato de que todos reduzem a taxa de crescimento do vegetal. Dessa forma, Rabe (1990) sugeriu que com a manutenção dos processos de absorção e redução do nitrogênio, a redução do crescimento leva ao acúmulo de amônia e síntese preferencial de alguns compostos nitrogenados, entre eles a prolina.

Diversas explicações para o acúmulo de aminoácidos livres em plantas sob estresse salino têm sido sugeridas. Estas incluem estímulo na síntese e inibição na degradação de aminoácidos, redução na síntese e/ou aumento na degradação de proteínas (Dhindsa & Cleland, 1975; Ranieri et al., 1989; Roy-Macauley, 1992). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o aumento na síntese *de novo* foi o mecanismo predominante no acúmulo da maioria dos aminoácidos livres analisados. A observação que o conteúdo de N-aminossolúveis e da maioria dos aminoácidos livres nas folhas e raízes aumentou com a salinidade, associada ao fato que os teores de proteínas solúveis não indicaram a ocorrência de proteólise, suportam esta hipótese.

Embora a concentração da maior parte dos aminoácidos livres tenha aumentado com a imposição do estresse salino, o padrão de distribuição dos aminoácidos entre as plantas controle e estressadas não diferiu grandemente durante o período experimental. Dessa forma, prolina, treonina, arginina, serina, aspartato, e glicina foram os aminoácidos livres mais abundantes, tanto nas folhas (constituindo mais de 80% do total) como nas raízes (constituindo mais de 60% do total). Independentemente do genótipo, da parte da planta ou do tratamento considerado, prolina foi sempre o aminoácido mais abundante durante todo o experimento, representando de 20 a 35% do total de aminoácidos livres.

O fracionamento de aminoácidos sugere que, dentre os aminoácidos livres, prolina, treonina, arginina, serina, aspartato, e glicina foram os que mais contribuíram para uma possível redução do potencial osmótico celular nas folhas e raízes de ambos os genótipos estudados. Analisando-se conjuntamente os resultados relativos ao acúmulo de carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e aminoácidos livres, nas folhas e raízes dos dois genótipos de milho, pode-se sugerir que o maior acúmulo destes solutos, principalmente nas raízes do genótipo tolerante (BR5033), como resultado do estresse salino, parece desempenhar um papel importante na tolerância deste genótipo ao estresse.

Variações consideráveis no acúmulo de carboidratos solúveis, proteínas solúveis, aminoácidos livres e outros compostos nitrogenados em resposta ao estresse salino são evidentes, tanto entre espécies como entre cultivares de uma mesma espécie. Em adição, o papel fisiológico e bioquímico destes compostos na tolerância à salinidade ainda é bastante especulativo. Embora, as informações relativas ao acúmulo destes compostos na adaptação das plantas à salinidade sejam insuficientes para concluir que eles são universalmente associados com o caráter de tolerância, isto não exclui seu papel como um indicador de tolerância à salinidade nos programas de melhoramento em algumas espécies vegetais.

5. Referências

- AGASTIAN, P.; KINGSLEY, S. J.; VIVEKANANDAN, M. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. **Photosynthetica**, v. 38, p. 287-290, 2000.
- ALI, G.; SRIVASTAVA, P. S.; IQBAL, M. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerants grown under NaCl stress. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 89-95, 1999.
- ASHRAF, M.; O'LEARY, J. W. Changes in soluble proteins in spring wheat stressed with sodium chloride. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 113-117, 1999.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.
- AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS FILHO, J.; LACERDA, C. F.; SILVA, J. V.; COSTA, P. H. A.; GOMES FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 31-38, 2004.
- BAJJI, M.; KINET, J. -M.; LUTTS, S. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. **Plant Science**, v. 137, p. 131-142, 1998.
- BINZEL, M. L.; HASEGAWA, P. M.; HANDA, A. K.; BRESSAN, R. A. Adaptation of tobacco cells to NaCl. **Plant Physiology**, v. 79, p. 118-125, 1985.
- BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 237-260, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 246-254, 1976.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: ASPP, 2000. p. 1158-1203.
- BÜSSIS, D.; HEINEKE, D. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. **Journal of Environmental Botany**, v. 49, p. 1361-1370, 1998.
- CHAMPIGNY, M. -L.; FOYER, C. H. Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 100, p. 7-12, 1992.
- DAI, Z.; KU, M. S. B.; EDWARDK, C. E. C₄ photosynthesis: The CO₂ concentrating mechanism and photorespiration. **Plant Physiology**, v. 103, p. 83-90, 1993.
- DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

- De VEAU, E. J.; BURRIS, J. E. Photorespiratory rates in wheat and maize as determined by ^{18}O -labeling. **Plant Physiology**, v. 90, p. 500-511, 1989.
- DHINDSA, R. S.; CLELAND, R. E. Water stress and protein synthesis. **Plant Physiology**, v. 55, p. 781-788, 1975.
- Di MARTINO, C.; DELFINE, S.; PIZZUTO, R.; LORETO, F.; FUGGI, A. Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. **New Phytologist**, v. 158, p. 455-463, 2003.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EL-SHINTINAWY, F.; EL-SHOUBAGY, M. N. Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by tiamine. **Biologia Plantarum**, v. 44, p. 541-545, 2001.
- FARINEU, J.; LELANDAIS, M.; MOROT-GAUDRY, J. -F. Operation of the glycolate pathway in isolated bundle sheath strands of maize and *Panicum maximum*. **Physiologia Plantarum**, v. 60, p.208-214, 1984.
- FOUGÈRE, F.; Le RUDULIER, D.; STREETER, J. G. Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, v. 96, p.1228-1236, 1991.
- FURBANK, R. T.; BADGER, M. R. Photosynthetic oxygen exchange in attached leaves of C_4 monocotyledons. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 9, p. 553-558, 1982.
- GADALLAH, M. A. A. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* response to salt stress. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 249-257, 1999.
- GILBERT, G. A.; GADUSH, M. V.; WILSON, C.; MADORE, M. A. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 107-114, 1998.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. -K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.
- HURKMAN, W. J.; FORNARI, C. S.; TANAKA, C. K. A comparison of the effect of salt on polypeptides and translatable mRNAs in roots of a salt tolerant and salt sensitive cultivar of barley. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1444-1456, 1989.
- LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M. A. O.; RUIZ, H. A.; PRISCO, J. T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 107-120, 2003.

- LARSSON, M. Translocation of nitrogen in osmotically stressed wheat seedlings. **Plant, Cell and Environment**, v. 15, p. 447-453, 1992.
- LAWLOR, D. W.; FOCK, H. Photosynthesis, respiration, and carbon assimilation in water-stressed maize at two oxygen concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v. 29, p. 579-593, 1978.
- LUTTS, S.; KINET, J. -M.; BOUHARMONT, J. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oriza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. **Plant Growth Regulation**, v. 19, p. 207-218, 1996.
- LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J. -M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oriza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 450-458, 1999.
- MANSOUR, M. M. F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 491-500, 2000.
- MATTIONI, C.; LACERENZA, N. G.; TROCCOLI, A.; De LEONARDIS, A. M.; Di FONZO, N. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 787-792, 1997.
- MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 28, p. 299-329, 1977.
- OLMOS, E.; HELLIN, E. Mechanisms of salt tolerance in a cell line of *Pisum sativum*: biochemical and physiological aspects. **Plant Science**, v. 120, p. 37-45, 1996.
- 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.
- PAREEK, A.; SINGLA, S. L.; GROVER, A. Salt responsive proteins/genes in crop plants. In: JAIWAL, P. K.; SINGH, R. B.; GULATI, A. (Eds.). **Strategies for improving stress tolerance in higher plants**. New Delhi: Oxford and IBH Publication Co, 1997. p. 365-391.
- PULICH Jr, W. M. Variations in leaf soluble amino acids and ammonium content in subtropical seagrasses related to salinity stress. **Plant Physiology**, v. 80, p. 283-286, 1986.
- RABE, E. Stress physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. **Journal of Horticultural Science**, v. 65, p. 231-243, 1990.
- RABE, E.; LOVATT, C. De novo arginine biosynthesis in leaves of phosphorus-deficient *Citrus* and *Poncirus* species. **Plant Physiology**, v. 76, p. 747-752, 1984.
- RAGGI, V. Changes in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water-stressed bean. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 427-434, 1994.
- RAMAGOPAL, S.; CARR, J. B. Sugarcane proteins and messenger RNAs regulated by salt in suspension cells. **Plant, Cell and Environment**, v. 14, p. 47-56, 1991.

RANIERI, A.; BERNARDI, R.; LANESE, P.; SOLDATINI, G. F. Changes in free amino acid content and protein pattern of maize seedlings under water stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 29, p. 351-357, 1989.

RHODES, D.; HANDA, S.; BRESSAN, R. A. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. **Plant Physiology**, v. 82, p. 890-903, 1986.

RICHARDSON, S. G.; McCREE, K. J. Carbon balance and water relations of sorghum exposed to salt and water stress. **Plant Physiology**, v. 79, p. 1015-1020, 1985.

RODRÍGUEZ, H. G.; ROBERTS, J. K. M.; JORDAN, W. R.; DREW, M. C. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. **Plant Physiology**, v. 113, p. 881-893, 1997.

ROY-MACAULEY, H.; ZUILY-FODIL, Y.; KIDRIC, M.; THI, A. T. P.; Da SILVA, J. V. Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 90-96, 1992.

SANTA-CRUZ, A.; PEREZ-ALFOCEA, F.; CARO, M.; ACOSTA, M. Polyamines as short-term salt tolerance traits in tomato. **Plant Science**, v. 138, p. 9-16, 1998.

SANTA-CRUZ, A.; ACOSTA, M.; RUS, A.; BOLARIN, M. C. Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 65-71, 1999.

SILVA, J. V.; LACERDA, C. F.; COSTA, P. H. A.; ENÉAS FILHO, J.; GOMES FILHO, E.; PRISCO, J. T. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl₂. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 99-105, 2003.

SINGH, N. K.; HANDA, A. K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells in NaCl. **Plant Physiology**, v. 79, p. 126-137, 1985.

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

SINGH, N. K.; LaROGE, P. C.; HANDA, A. K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cell. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 84, p. 739-743, 1987b.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Advances in Physiology Education**, v. 28 p. 155-159, 2004.

SULTANA, N.; IKEDA, T.; ITOH, R. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, p. 211-220, 1999.

TAN, W.; BLAKE, T. J.; BOYLE, J. B. Drought tolerance in faster- and slower-growing black spruce (*Picea mariana*) progenies: II. Osmotic adjustment and changes of soluble carbohydrates and amino acids under osmotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 645-651, 1992.

THAKUR, P. S.; RAI, V. K. Dynamics of amino acid accumulation of two differentially drought resistant *Zea mays* cultivars in response to osmotic stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 22, p. 221-226, 1982.

TULLY, R. E.; HANSON, A. D.; NELSEN, C. E. Proline accumulation in water-stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget. **Plant Physiology**, v. 63, p. 518-523, 1979.

UMA, S.; PRASAD, T. G.; KUMAR, M. U. Genetic variability in recovery growth and synthesis of stress proteins in response to polyethylene glycol and salt stress in finger millet. **Annals of Botany**, v. 76, p. 43-49, 1995.

VANCE, N. C.; ZAERR, J. B. Analysis by high-performance liquid chromatography of free amino acids extracted from needles of drought-stressed and shaded *Pinus ponderosa* seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 23-30, 1990.

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

YOSHIMURA, Y.; KUBOTA, F.; UENO, O. Structural and biochemical bases of photorespiration in C₄ plants: quantification of organelles and glycine decarboxylase. **Planta**, v. 220, p. 307-317, 2004.

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

CAPÍTULO 4

Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes

(Cópia do trabalho enviado para a revista *Environmental and Experimental Botany*, registrado sob nº EEB-40-178 e aceito para publicação em 07/01/2005, obedecendo as normas deste periódico, excetuando-se a numeração das figuras)

Abstract

1. Introduction

2. Material and methods

2.1. Plant material, growth and treatment conditions

2.2. Extract preparation

2.3. Enzyme assays

2.4. Lipid peroxidation

2.5. Statistical analysis

3. Results

3.1. Enzyme activity

3.2. Lipid peroxidation

4. Discussion

Acknowledgments

5. References

Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes

André Dias de Azevedo Neto^{1,a}, José Tarquinio Prisco^a, Joaquim Enéas-Filho^a, Carlos Eduardo Braga de Abreu^a, Enéas Gomes-Filho^{a*}

^a *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6039, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brazil*

Abstract

The effects of salt stress on the activity of antioxidative enzymes and lipid peroxidation were studied in leaves and roots of two maize genotypes, BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive), grown under control (nutrient solution) or salt stress (nutrient solution containing 100 mM NaCl) conditions. Leaves and roots of control and salt-stressed plants were harvested at various times starting one day prior to initiating the salt treatment. In leaves of salt-stressed plants, SOD, APX, GPX and GR activities increased with time when compared to the controls. The increase in enzyme activities were more pronounced in the salt-tolerant than in the salt-sensitive genotype. Salt stress had no significant effect on CAT activity in the salt-tolerant, but it was reduced significantly in the salt-sensitive genotype. In salt-stressed roots of the salt-tolerant genotype, SOD and CAT activities decreased and APX, GPX and GR activities remained unchanged in comparison with the control. In roots of the salt-sensitive genotype, salinity reduced the activity of all studied enzymes. The data show that CAT and GPX enzymes had the greatest H₂O₂ scavenger activity in both leaves and roots.

¹ Present address: Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55-85-288-9405; fax: +55-85-288-9829. E-mail address: egomesf@ufc.br

Moreover, CAT, APX and GPX activities in conjunction with SOD seem to play an essential protective role in the scavenging processes. Lipid peroxidation was enhanced only in salt-stressed leaves of the salt-sensitive genotype. These results indicate that oxidative stress may play an important role in salt-stressed maize plants and that the greater protection of BR5033 leaves and roots from salt-induced oxidative damage results, at least in part, through the maintenance and/or increase of the activity of antioxidant enzymes.

Keywords: salt stress; oxidative stress; antioxidative enzymes, lipid peroxidation; maize; *Zea mays*.

1. Introduction

Salinization plays a major role in soil degradation. It affects 19.5% of irrigated land and 2.1% of dry land agriculture existing on the globe (FAO, 2000). Salinity effects are more conspicuous in arid and semiarid regions, where limited rainfall, high evapotranspiration and high temperature associated with poor water and soil management contribute to the salinity problem and become of great importance for agriculture production in these regions.

Plant salt tolerance has generally been studied in relation to regulatory mechanisms of ionic and osmotic homeostasis (Niu et al., 1995; Hare et al., 1998; Yeo, 1998; Zhu, 2003; Ashraf and Harris, 2004). In addition to ionic and osmotic components, salt stress, like other abiotic stresses, also leads to oxidative stress through an increase in reactive oxygen species (ROS) such as superoxide ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals (OH^{\bullet}) (Alscher et al., 1997; Mittler, 2002; Neill et al., 2002). These ROS are highly reactive and can alter normal cellular metabolism through oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids (McKersie and Leshem, 1994; Alscher et al., 1997; Imlay, 2003).

To mitigate the oxidative damage initiated by ROS, plants have developed a complex defense antioxidative system, including low-molecular mass antioxidants as well as antioxidative enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) (McKersie and Leshem, 1994; Noctor and Foyer, 1998). SOD is the major $O_2^{\bullet-}$ scavenger and its enzymatic action results in H_2O_2 and O_2 formation. The H_2O_2 produced is then scavenged by CAT and several classes of peroxidases. CAT, which is found in peroxisomes, cytosol and mitochondria, dismutates H_2O_2 into H_2O and O_2 (McKersie and Leshem, 1994). Peroxidases (APX and GPX) are distributed throughout the cell and catalyze the reduction of H_2O_2 to H_2O . APX uses ascorbate as electron donor in the first step of the ascorbate-glutathione cycle and is considered the most important plant peroxidase in H_2O_2 detoxification (Noctor and Foyer, 1998). GPX, which is less specific to electron donor substrate, decomposes H_2O_2 by oxidation of co-substrates such as phenolic compounds and/or ascorbate. Reduced glutathione (GSH) is involved in regenerating the ascorbate pool producing oxidized glutathione (GSSG). The NADPH-dependent GSSG reduction is catalyzed by GR, a flavoenzyme found in the chloroplast, cytosol and mitochondria (Edwards et al., 1990). GR catalyzes the last and rate limiting step of the Halliwell–Asada enzymatic pathway (Bray et al., 2000). The elevated levels of GR activity could increase the GSH/GSSG ratio, which is required for ascorbate regeneration and activation of several CO_2 fixing enzymes in the chloroplasts (Crawford et al., 2000), ensuring $NADP^+$ availability to accept electrons from the photosynthetic electron transport chain.

Malondialdehyde (MDA) content, a product of lipid peroxidation, has been considered an indicator of oxidative damage. Thus, cell membrane stability has been widely utilized to differentiate salt-tolerant and salt-sensitive cultivars (Dionisio-Sese and Tobita, 1998; Luna et al., 2000; Shalata et al., 2001; Hernández and Almansa, 2002; Meloni et al., 2003).

Some evidence suggests that resistance to oxidative stress may, at least in part, be involved in salt stress tolerance (Gosset et al., 1994; Gueta-Dahan et al., 1997; Hernández et al., 2000; Mittova et al., 2002; Badawi et al., 2004). However, most of these studies were performed with leaves and scarce information is available for the root, which is usually the first organ directly exposed to the salt stress.

The response of maize antioxidative system to abiotic stresses has been studied under anoxia (Yan et al., 1996), low temperature (Iannelli et al., 1999), drought (Aroca et al., 2003), aluminum and heavy metals toxicity (Boscolo et al., 2003; Zacchini et al., 2003) and nutritional deficiencies (Tewari et al., 2004). However, studies related to the maize antioxidative system towards salt stress conditions are scarce. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of salt stress on the activity of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two maize genotypes differing in salt tolerance, in order to better understand the physiological and biochemical mechanisms of salt tolerance.

2. Material and methods

2.1. Plant material, growth and treatment conditions

Seed of two maize genotypes, BR-5033 (salt-tolerant) and BR-5011 (salt-sensitive) (Azevedo Neto et al., 2004) were sown in trays containing vermiculite and irrigated daily with distilled water. Four-day-old seedlings were transferred to trays containing aerated half-strength Hoagland nutrient solution. Nine days later, they were transferred to 3 L plastic pots containing full-strength nutrient solution (control treatment) or nutrient solution with 100 mM NaCl (salt stress treatment). Salt additions (25 mM per day) began on transplantation into the plastic pots. Plants were harvested one day before and 5, 10, 15, 20 and 25 days after the start of the salt treatment when leaves and roots were cut, frozen in liquid nitrogen, lyophilized, ground to a powder and kept in a freezer (-25°C) for further analyses. The experiment was

carried out under glasshouse conditions. The mean values of temperature, air relative humidity and photosynthetic active radiation (at noon) were 27 °C, 65% and 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively.

2.2. Extract preparation

Lyophilized leaf (0.20 g) and root (0.15 g) powder were homogenized in a mortar and pestle with 4 mL of ice-cold extraction buffer (100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.1 mM EDTA). The homogenate was filtered through muslin cloth and centrifuged at 16,000 $\times g$ for 15 min. The supernatant fraction was used as crude extract for enzyme activity and lipid peroxidation assays. All operations were carried out at 4 °C.

2.3. Enzyme assays

Total SOD (EC 1.15.1.1) activity was determined by measuring its ability to inhibit the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium chloride (NBT), as described by Giannopolitis and Ries (1977). The reaction mixture (1.5 mL) contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 μM EDTA, 13 mM methionine, 75 μM NBT, 2 μM riboflavin and 50 μL enzyme extract. Riboflavin was added last and tubes were shaken and illuminated with a two 20-W fluorescent tubes. The reaction was allowed to proceed for 15 min after which the lights were switched off and the tubes covered with a black cloth. Absorbance of the reaction mixture was read at 560 nm. One unit of SOD activity (U) was defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of the NBT photoreduction rate and the results expressed as U mg^{-1} of dry mass (DM).

Total CAT (EC 1.11.1.6) activity was measured according the method of Beers and Sizer (1952), with minor modifications. The reaction mixture (1.5 mL) consisted of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 μM EDTA, 20 mM H_2O_2 and 50 μL enzyme extract. The

reaction was started by addition of the extract. The decrease of H_2O_2 was monitored at 240 nm and quantified by its molar extinction coefficient ($36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the results expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ DM}$.

Total APX (EC 1.11.1.1) activity was assayed according to Nakano and Asada (1981). The reaction mixture (1.5 mL) contained 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), 0.1 μM EDTA, 0.5 mM ascorbate, 1.0 mM H_2O_2 and 50 μL enzyme extract. The reaction was started by addition of H_2O_2 and ascorbate oxidation measured at 290 nm for 1 min. Enzyme activity was quantified using the molar extinction coefficient for ascorbate ($2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the results expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ DM}$, taking into consideration that two mols ascorbate are required for reduction of one mol H_2O_2 (McKersie e Leshem, 1994).

Total GPX (EC 1.11.1.7) activity was determined as described by Urbanek et al. (1991) in a reaction mixture (2.0 mL) containing 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 μM EDTA, 5.0 mM guaiacol, 15.0 mM H_2O_2 and 50 μL enzyme extract. The addition of enzyme extract started the reaction and the increase in absorbance was recorded at 470 nm for 1 min. Enzyme activity was quantified by the amount of tetraguaiacol formed using its molar extinction coefficient ($26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The results were expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ DM}$ taking into consideration that 4 mols H_2O_2 are reduced to produce one mol tetraguaiacol (Plewa et al. 1991).

Total GR activity (EC 1.6.4.2) was assayed as described by Foyer and Halliwell (1976), with minor modifications. The reaction mixture (1.0 mL) consisted of 100 mM phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 μM EDTA, 0.05 mM NADPH, 3.0 mM GSSG and 50 μL enzyme extract. The reaction was started by the addition of GSSG and the NADPH oxidation rate was monitored at 340 nm for 1.0 min. Enzyme activity was determined using the molar extinction coefficient for NADPH ($6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and expressed as $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ DM}$.

2.4. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by measuring the amount of MDA produced by the thiobarbituric acid reaction as described by Heath and Packer (1968). The crude extract was mixed with the same volume of a 0.5% (w/v) thiobarbituric acid solution containing 20% (w/v) trichloroacetic acid. The mixture was heated at 95 °C for 30 min and then quickly cooled in an ice-bath. The mixture was centrifuged at $3\,000 \times g$ for 10 min and the absorbance of the supernatant was monitored at 532 and 600 nm. After subtracting the non-specific absorbance (600 nm), the MDA concentration was determined by its molar extinction coefficient ($155\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and the results expressed as $\mu\text{mol MDA g}^{-1}\text{ DM}$.

2.5. Statistical analysis

The experimental design was a completely randomized factorial, six (harvest periods) \times two (genotypes) \times two (salt levels) with five replicates. For each extract the absorbance was determined on duplicate assays. The standard deviations are given with the means.

3. Results

3.1. Enzyme activity

Leaf and root SOD activity increased until the 10th day for control and salt-stressed plants of both genotypes, remaining fairly constant thereafter (Fig. 4.1). Leaf SOD activity was greater in salt-stressed plants than in controls (Fig. 4.1A and 4.1B). Salt-induced SOD activity was more conspicuous in BR5033 (42%) than in BR5011 (21%). On the other hand, salinity reduced SOD activity in roots (Fig. 4.1C and 4.1D) by approximately 31 and 40% for BR5033 and BR5011, respectively.

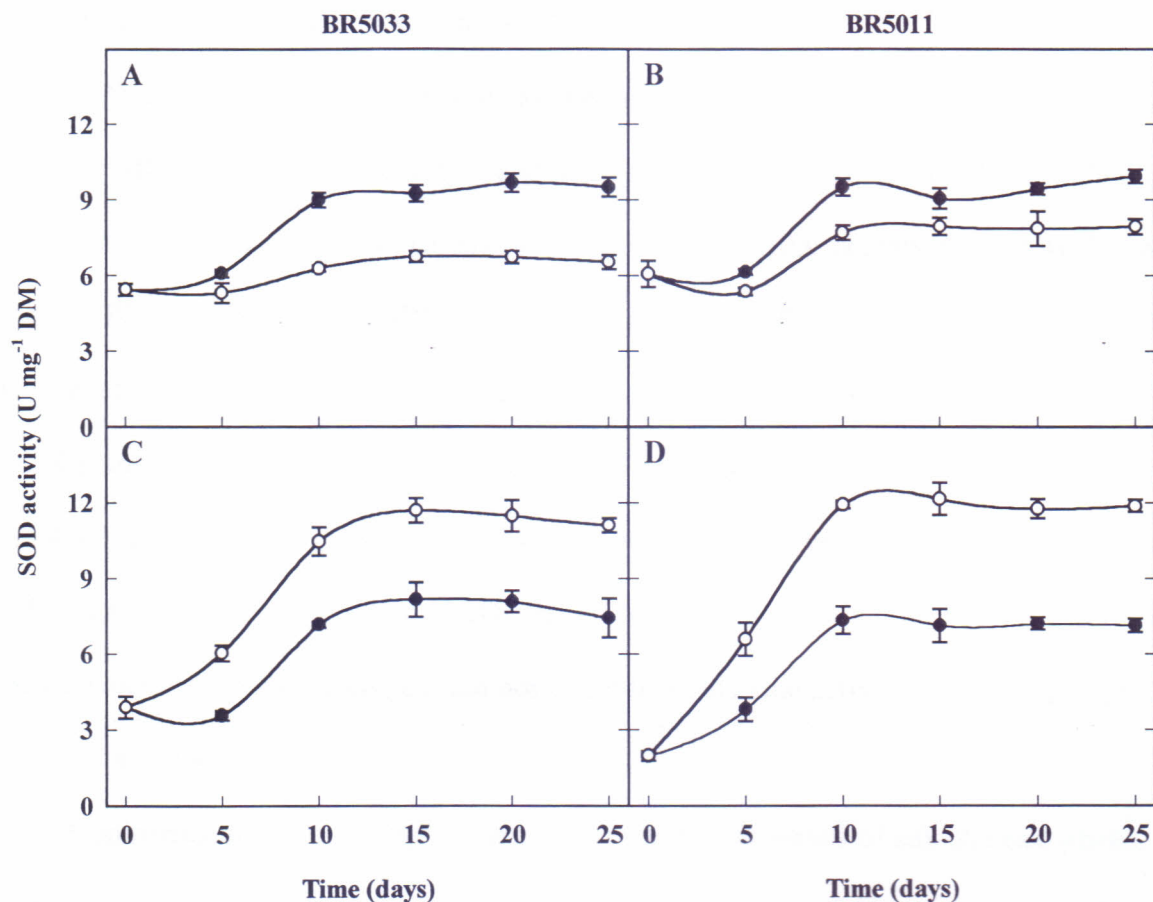


Fig. 4.1. Time course of total SOD activity in leaves (A and B) and roots (C and D) of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control (open symbols) and salt stress (closed symbols) conditions. The first harvest (day 0) was taken one day before the start of salt additions. Plants were subjected to 100 mM NaCl for 21 days after completing the NaCl addition. Time represents days after the first harvest. Values indicate the mean \pm SD.

CAT activity in leaves and roots for control and salt-stressed plants changed during the experimental period in both genotypes (Fig. 4.2). Salt stress did not affect leaf CAT activity of BR5033 (Fig. 4.2A), but reduced it significantly in roots of BR5033 (Fig. 4.2C) and in leaves (Fig. 4.2B) and roots (Fig. 4.2D) of BR5011.

APX activity in leaves of both genotypes was remarkably increased as a result of salt stress, not affected in roots of BR5033 and slightly decreased in roots of BR5011, although significant (Fig. 4.3). A similar pattern was observed for GPX activity (Fig. 4.4). In salt-stressed BR5033 plants, leaf APX (Fig. 4.3A) and GPX (Fig. 4.4A) activities increased approximately 137 and 58%, respectively, after the 10th day of stress when compared to control plants. In leaves of BR5011, salinity also increased the APX (Fig. 4.3B) and GPX (Fig. 4.4B) activities, but these increases were lower than observed in BR5033. On the other hand, salt stress reduced APX (Fig. 4.3D) and GPX (Fig. 4.4D) activities in BR5011 roots by nearly 29 and 55%, respectively, but did not affect these enzyme activities in roots of BR5033 (Fig. 4.3C and 4.4C).

Comparing activities of H₂O₂ scavenging enzymes in leaves of salt-stressed plants, at the end of the experimental period, CAT activity was 7- and 66-fold greater than GPX and APX activities, respectively. On the other hand, GPX activity in stressed roots was 15- and 100-fold greater than CAT and APX activities, respectively. It is noteworthy that GPX activity was extremely higher in roots than in leaves for both control and salt-stressed plants.

GR activity increased with time in control and salt-stressed plants of BR5033 and BR5011 genotypes (Fig. 4.5). GR activity was greater in leaves of salt-stressed plants than in control plants (Figs. 4.5A and 4.5B). GR activity was less affected by salinity (Fig. 4.5C) in roots of BR5033, but in roots of BR5011, it was decreased by approximately 30% after 15 days of salinization (Fig. 4.5D).

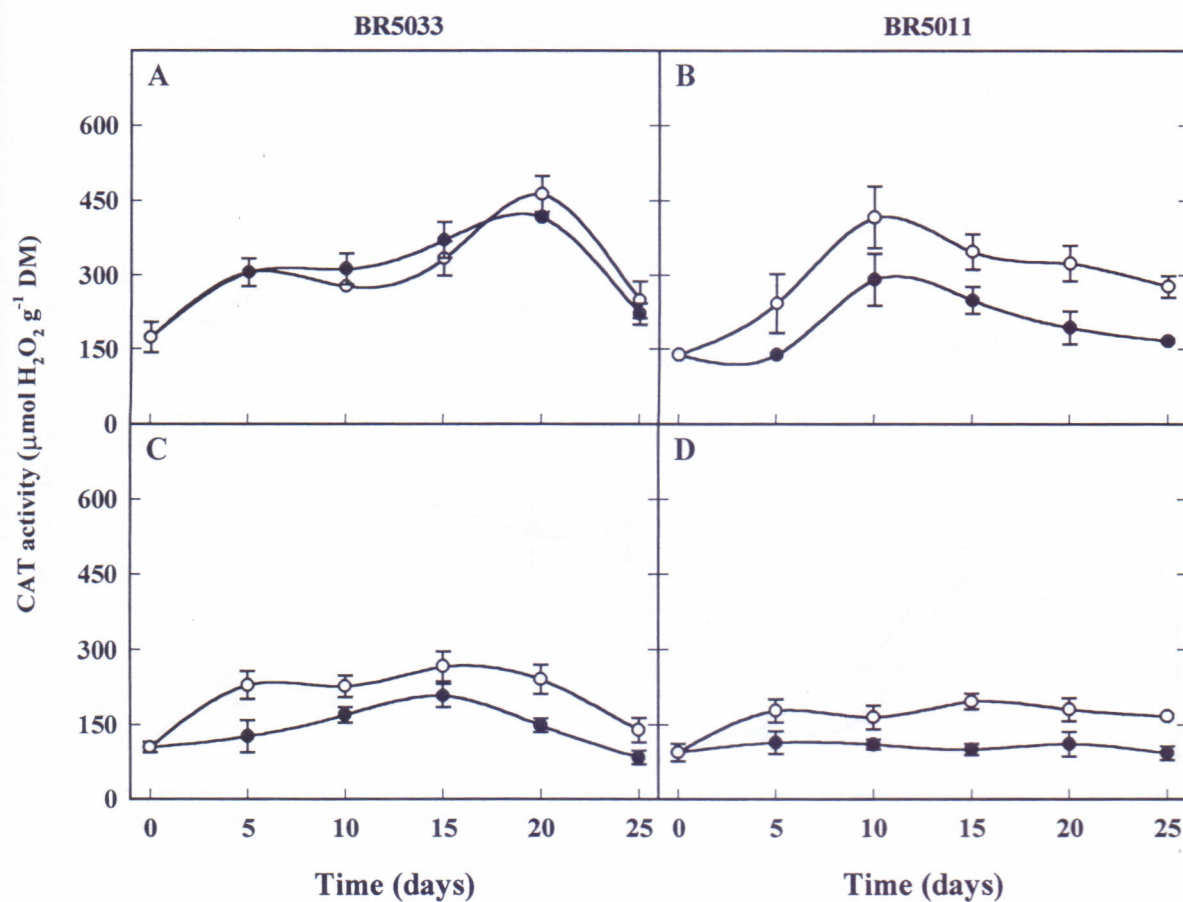


Fig. 4.2. Time course of total CAT activity in leaves (A and B) and roots (C and D) of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control (open symbols) and salt stress (closed symbols) conditions. Additional details as in Fig. 4.1.

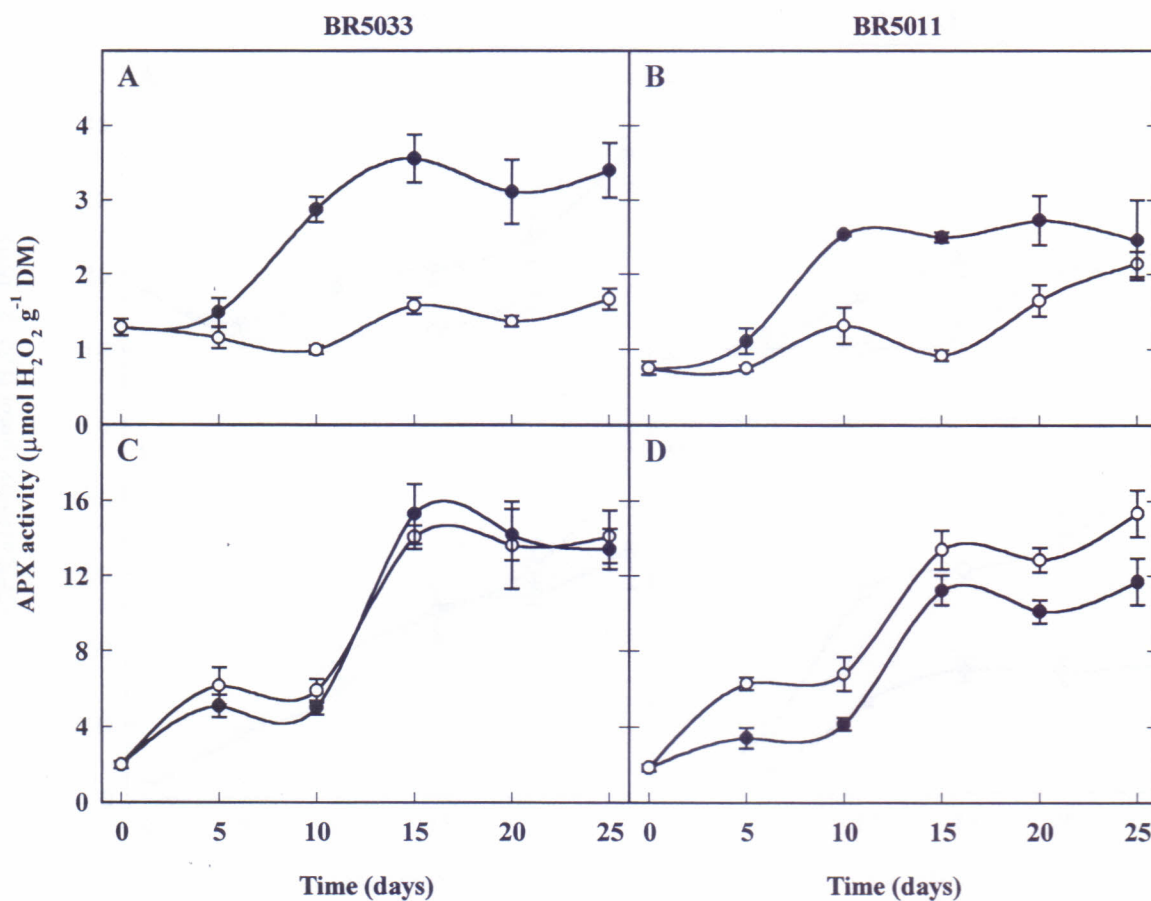


Fig. 4.3. Time course of total APX activity in leaves (A and B) and roots (C and D) of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control (open symbols) and salt stress (closed symbols) conditions. Additional details as in Fig. 4.1.

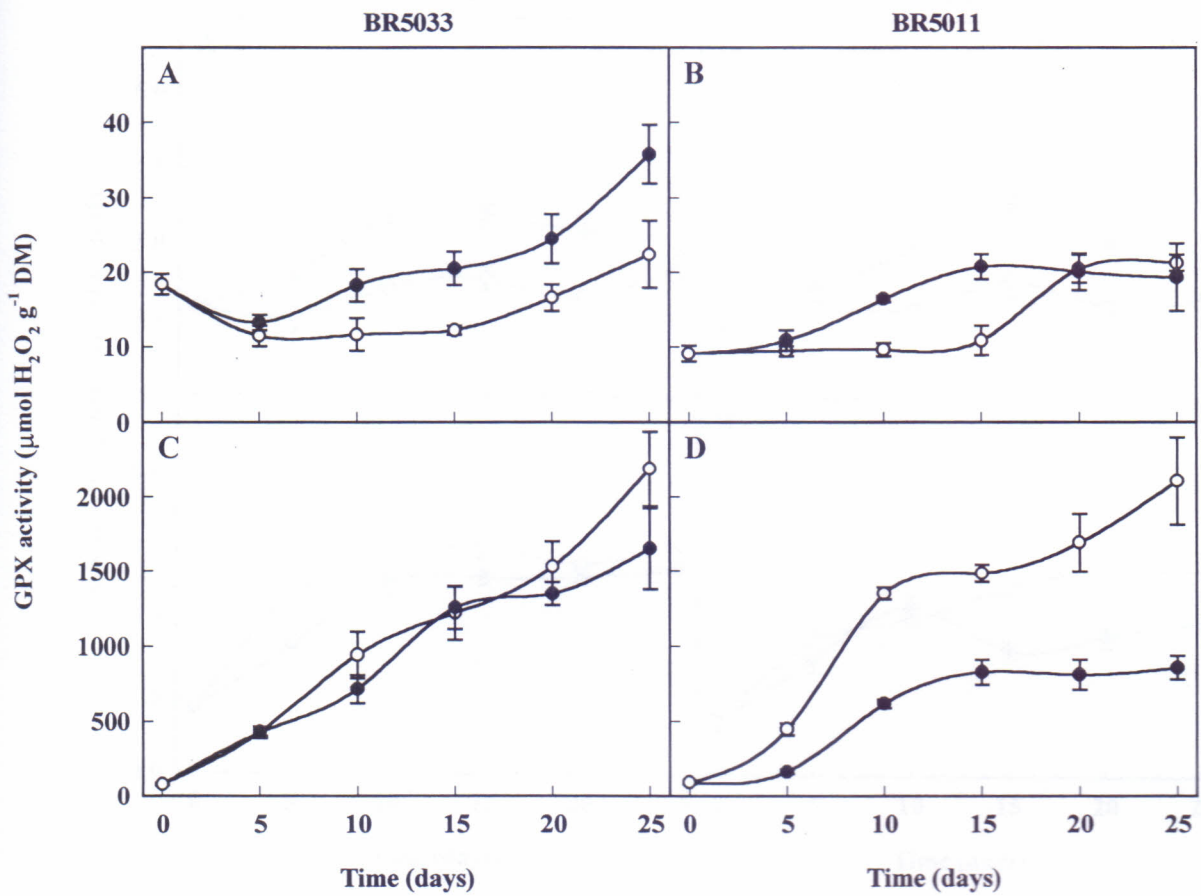


Fig. 4.4. Time course of total GPX activity in leaves (A and B) and roots (C and D) of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control (open symbols) and salt stress (closed symbols) conditions. Additional details as in Fig. 4.1.

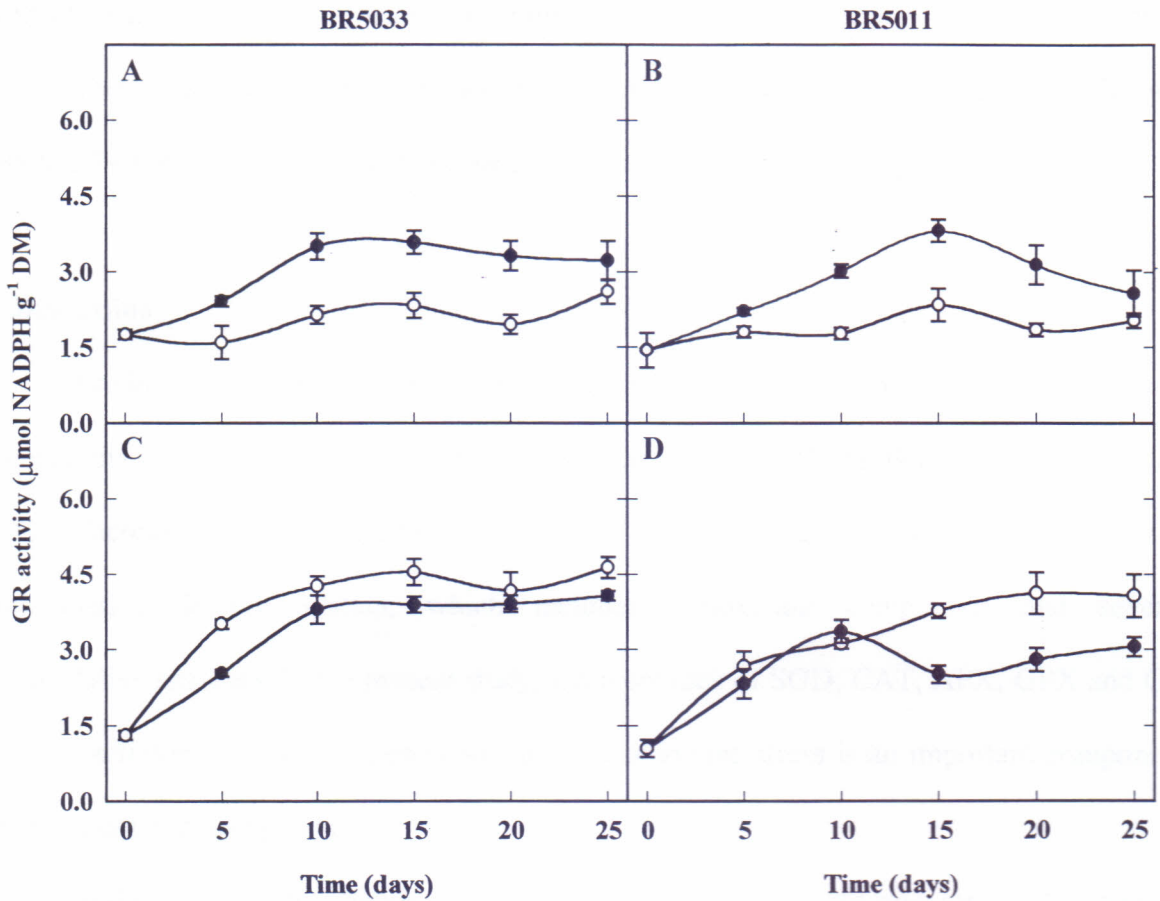


Fig. 4.5. Time course of total GR activity in leaves (A and B) and roots (C and D) of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control (open symbols) and salt stress (closed symbols) conditions. Additional details as in Fig. 4.1.

3.2. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation in leaves and roots of both maize genotypes, measured as MDA content, is given in Fig. 4.6. In leaves of control plants, the MDA content increased up to 20 days after of salt addition and then declined (Figs. 4.6A and 4.6B). In BR5033, the MDA content in leaves was not affected by salinity (Fig. 4.6A) and decreased by approximately 11% in roots (Fig. 4.6C). In salt-stressed BR5011, the amount of MDA increased significantly (about 24%) in leaves (Fig. 4.6B) and remained unaffected in roots (Fig. 4.6D).

4. Discussion

Environmental stresses limiting photosynthesis can increase oxygen-induced cellular damage due to increased ROS generation (Alscher et al., 1997; Mittler, 2002; Neill et al., 2002). Therefore, salt stress resistance may depend, at least in part, on the enhancement of the antioxidative defense system, which includes antioxidant compounds and several antioxidative enzymes. In the present study, the responses of SOD, CAT, APX, GPX and GR enzyme activities and MDA content suggest that oxidative stress is an important component of salt stress in maize plants.

SOD is one of the ubiquitous enzymes in aerobic organisms and plays a key role in cellular defense mechanisms against ROS. Its activity modulates the relative amounts of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 , the two Haber-Weiss reaction substrates, and decreases the risk of OH^{\bullet} radical formation, which is highly reactive and may cause severe damage to membranes, protein and DNA (Bowler et al., 1992). In this work, salt stress increased SOD activity in leaves and reduced it in roots of both genotypes. However, the increased SOD activity in leaves was more conspicuous in BR5033 (salt-tolerant) while reduction in roots was greater in BR5011 (salt-sensitive), suggesting that the salt-tolerant genotype has a better $O_2^{\bullet-}$ radical scavenging ability. It has been shown that salinity increases SOD activity in salt-tolerant cultivars and

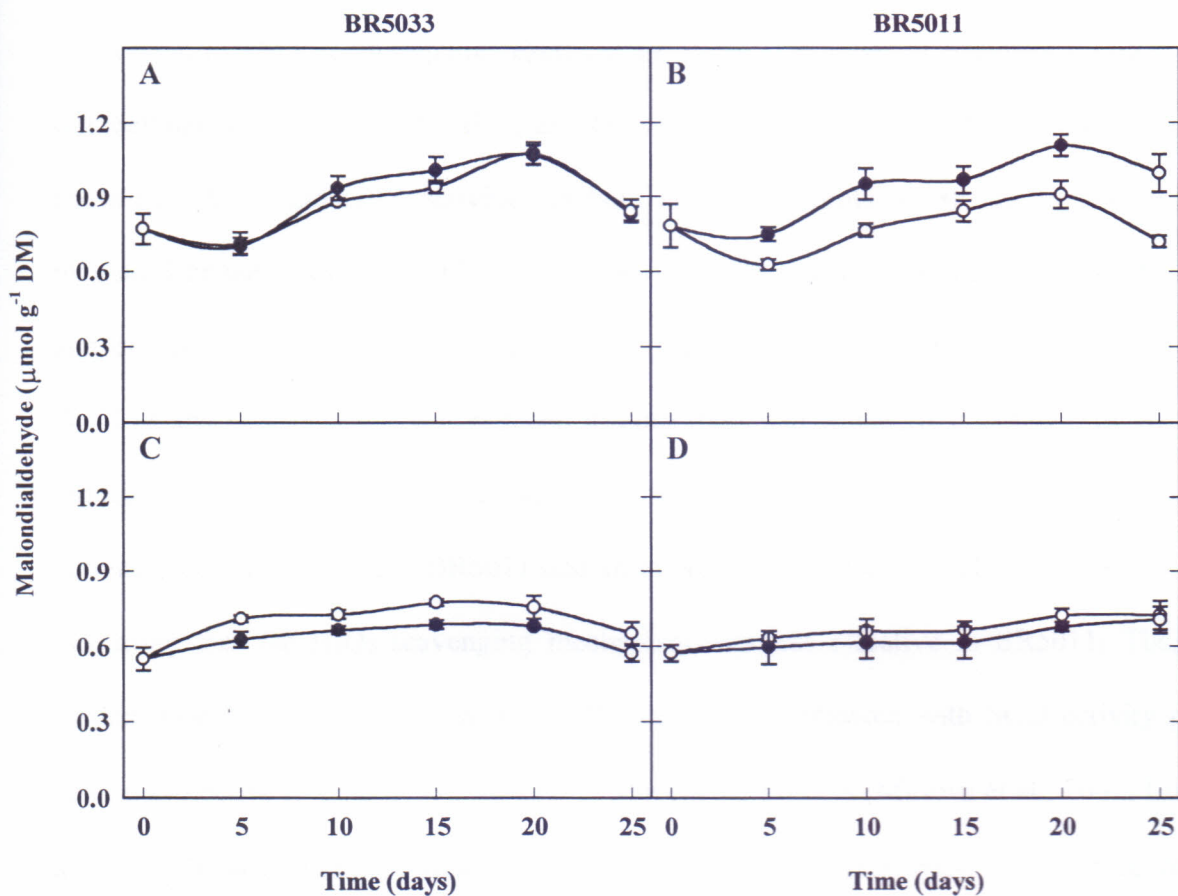


Fig. 4.6. Time course of malondialdehyde content in leaves (A and B) and roots (C and D) of BR5033 (salt-tolerant) and BR5011 (salt-sensitive) maize genotypes grown under control (open symbols) and salt stress (closed symbols) conditions. Additional details as in Fig. 4.1.

decreases it in salt-sensitive cultivars, in both leaves (Gosset et al., 1994; Dionísio-Sese and Tobita, 1998; Hernández et al., 2000) and roots (Shalata et al., 2001). In addition, Badawi et al. (2004) reported that transgenic tobacco plants overexpressing Cu/Zn-SOD showed enhanced tolerance to salt and water stresses as well as polyethylene glycol-induced stress.

The product of SOD activity is H_2O_2 , which is still toxic and must be eliminated by conversion to H_2O in subsequent reactions. In plants, a number of enzymes regulate H_2O_2 intracellular levels, but CAT, APX, and GPX are considered the most important. Our data show that APX, and GPX activities in both leaves and roots of BR5033 genotype either increased or were not affected by salinity, and that CAT activity was not affected in leaves and decreased in the roots. In contrast, APX and GPX activities were reduced in roots of BR5011 and CAT activity was reduced in both roots and leaves. It is noteworthy that salt-induced SOD activity in the leaves was accompanied by a greater increase in APX and GPX activities in BR5033 than in BR5011 and an important decrease in CAT activity in BR5011, indicating that the H_2O_2 scavenging mechanism was less effective in BR5011. Thus, our results suggests that CAT, APX and GPX activities coordinated with SOD activity play a central protective role in the $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 scavenging process (Mittova et al., 2002; Liang et al., 2003; Badawi et al., 2004) and the active involvement of these enzymes is related, at least in part, to salt-induced oxidative stress tolerance in maize plants.

When the activity values of the H_2O_2 scavenging enzymes were compared (Fig. 4.2, 4.3 and 4.4) it was observed that CAT and GPX had a much higher H_2O_2 scavenging activity than APX in leaves and roots of both control and salt-stressed maize plants. Therefore, it could be hypothesized that CAT is the most important among the H_2O_2 scavenging enzymes in leaves, while the non-specific peroxidase (GPX) seems to play a key role in roots. Our results are in agreement with those of Rout and Shaw (2001), who suggested that CAT and GPX were the most important H_2O_2 scavenging enzymes leading to salt tolerance in aquatic

macrophytes. In addition, these enzymes were also important in salt tolerance in mulberry (Sudhakar et al., 2001), cotton (Gosset et al., 1994; Meloni et al., 2003) and barley (Liang et al., 2003) cultivars.

Our results show that GR activity in leaves of salt-stressed plants was greater than control plants. On the other hand, salinity significantly reduced GR activity in roots of the BR5011 genotype. Broadbent et al. (1995) found that transgenic tobacco plants overexpressing GR had both high levels of GSH and increased tolerance to oxidative stress. Several authors investigating salt-tolerant and salt-sensitive cultivars have suggested that the salt tolerance character is related to increased GR activity in salt-tolerant cultivars (Hernández et al., 2000; Sudhakar et al., 2001; Meloni et al., 2003). In roots of salt-stressed BR5011, the reduction in GR activity suggests a decreased GSH turnover rate. Considering that salinity also reduced APX activity in roots of BR5011, our results suggest that salt-sensitive genotypes exhibit a less active ascorbate-glutathione cycle in roots and that the Halliwell-Asada enzymatic pathway may play a key role in salt tolerance in roots of maize plants.

Salt stress is known to result in extensive lipid peroxidation, which has often been used as indicator of salt-induced oxidative damage in membranes (Hernández e Almansa, 2002). Parallel to these observations, we observed that MDA content was unaffected by salinity in leaves of BR5033, but increased significantly in leaves of BR5011. The lower level of lipid peroxidation in BR5033 suggests, therefore, that salt-tolerant plants are better protected from oxidative damage under salt stress. On the other hand, the MDA concentration decreased slightly in roots of salt-stressed BR5033 and remained unaffected in roots of BR5011. The development of salt-dependent oxidative stress in BR5011 leaves probably results from the lack of salt-dependent up-regulation of its antioxidative system. The observation that BR5033 leaves can up-regulate the antioxidative system in response to salt stress further supports the above conclusion. Similar results correlating lipid peroxidation to

antioxidative system activity were also reported by other researchers (Gosset et al., 1994; Shalata and Tal, 1998; Hernández and Almansa, 2002).

With regard to MDA reduction in salt-stressed BR5033 roots, our results are in agreement with those of Shalata et al. (2001) for roots of *Lycopersicon pennellii*. These authors suggested the reduction of MDA content was due to increased antioxidative enzyme activities, which reduced H₂O₂ levels and membrane damage. In the present work, the MDA concentration reduction in salt-stressed roots of BR5033 appears to be associated with a decrease in SOD activity and maintenance of APX and GPX activities, which could lead to reduced H₂O₂ concentration, and consequently lipid peroxidation in roots of this genotype.

It has been demonstrated that both osmotic and ionic effects involved in NaCl salinity can limit photosynthesis and respiration leading to an increase in ROS generation, which are responsible for a secondary oxidative stress that can damage cellular structure and metabolism. It is also known that plant responses to salt stress are multigenic, involving both osmotic and ionic homeostasis, as well as cell detoxification. The efficiency of the latter process is dependent upon the plant antioxidant defense mechanisms (Zhu, 2001; Sairam and Tyagi, 2004). Although our experiments did not discriminate between osmotic and ionic (nutritional imbalance and toxicity) effects of NaCl salinity, the obtained results showed that the differences in the antioxidative enzyme activities of leaves and roots may, at least in part, explain the greater tolerance of BR5033 to salt stress when compared to BR5011, and that the lipid peroxidation level in leaves may be an important biochemical trait for salt stress tolerance in maize plants.

Acknowledgements: We thank Dr Ladaslav Sodek for reviewing the English text, and acknowledge the financial support given by Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. *Physiol. Plant.* 100, 224-233.
- Aroca, R., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M., 2003. Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. *Physiol. Plant.* 117, 540-549.
- Ashraf, M., Harris, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166, 3-16.
- Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas Filho, J., Lacerda, C.F., Silva, J.V., Costa, P.H.A., Gomes Filho, E., 2004. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Braz. J. Plant Physiol.* 16, 31-38.
- Badawi, G.H., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Naoyoshi, K., Tanaka, K., Tanaka, K., 2004. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Sci.* 166, 919-928.
- Beers Jr, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133-140.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A., 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochem.* 62, 181-189.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116.

- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. ASPP, Rockville, pp. 1158-1203.
- Broadbent, P., Creissen, G.P., Kular, B., Wellburn, A.R. Mullineaux, P., 1995. Oxidative stress responses in transgenic tobacco containing altered levels of glutathione reductase activity. *Plant J.* 8, 247-255.
- Crawford, N.M., Kahn, M.L., Leustek, T., Long, S.R., 2000. Nitrogen and Sulfur. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. ASPP, Rockville, pp. 786-849.
- Dionisio-Sese, M.L., Tobita, S., 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.*, 135, 1-9.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S.R., Mullineaux, P.M., 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180, 278-284.
- FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. 2000. Available in: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>. Access in: may 10 2004.
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
- Gosset, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C., 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.* 34, 706-714.

- Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B.A., Ben-Hayyim, G., 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta* 203, 460-469.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21, 535-553.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189-198.
- Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P., Sevilla, F., 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23, 853-862.
- Hernández, J.A., Almansa, M.S., 2002. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiol. Plant.* 115, 251-257.
- Iannelli, M.A., Breusegem, F.V., Montagu, M.V., Inzé, D., Massacci, A., 1999. Tolerance to low temperature and paraquat-mediated oxidative stress in two maize genotypes. *J. Exp. Bot.* 50, 523-532.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418.
- Liang, Y., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W., Ding, R., 2003. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.* 160, 1157-1164.
- Luna, C., Seffino, L.G., Arias, C., Taleisnik, E., 2000. Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. *Plant Breeding* 119, 341-345.
- McKersie, B.D., Leshem, Y.Y., 1994. Stress and stress coping in cultivated plants, Kluwer Academic Publishes, Dordrecht.

- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J., 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 49, 69-76.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M., 2002. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol. Plant.* 115, 393-400.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J., 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 388-395.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M., 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 109, 735-742.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- Plewa, M.J., Smith, S.R., Wagner, E.D., 1991. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Res.* 247, 57-64.
- Rout, N.P., Shaw, B.P., 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Sci.* 160, 415-423.
- Sairam, R.K., Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86, 407-421.

- Shalata, A., Tal, M., 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol. Plant.* 104, 169-174.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M., 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol. Plant.* 112, 487-494.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A., Giridarakumar, S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci.* 161, 613-619.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Tewari, N., Srivastava, S., Sharma, P.N., 2004. Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses-influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Sci.* 166, 687-694.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E., Herka, K., 1991. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Phys. Plant.* 13, 43-50.
- Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S. and Wang, Z., 1996. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant Soil*, 179, 261-268.
- Yeo, A., 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49, 915-929.
- Zacchini, M., Rea, E., Tullio, M., Agazio, M., 2003. Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment. *Plant Physiol Biochem.* 41, 49-54.
- Zhu, J.-K., 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 66-71.
- Zhu, J.-K., 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 441-445.

CAPÍTULO 5

Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants

(Cópia do trabalho enviado para publicação na revista **Journal of Plant Physiology**, registrado sob nº JPP-H-04-1065 e aceito para publicação em 05/01/2005, obedecendo as normas deste periódico, excetuando-se a numeração das figuras)

Summary

Abbreviations

1. Introduction

2. Materials and methods

2.1. Plant material, growth and treatment conditions

2.2. Extract preparation

2.3. Enzyme assays

2.4. Lipid peroxidation

3. Results

3.1. Plant growth

3.2. Enzyme activity

3.3. Lipid peroxidation

4. Discussion

Acknowledgements

5. References

Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants

André Dias de Azevedo Neto^a, José Tarquinio Prisco^b, Joaquim Enéas-Filho^b, Jand-Venes Rolim Medeiros^b, Enéas Gomes-Filho^{b,*}

^a*Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil;* ^b*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6039, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brazil;* **Corresponding author.*

Summary

The effect of exogenously applied H₂O₂ on salt stress acclimation was studied with regard to plant growth, lipid peroxidation, and activity of antioxidative enzymes in leaves and roots of a salt-sensitive maize genotype. Pre-treatment by addition of 1 μM H₂O₂ to the hydroponic solution for 2 days induced an increase in salt tolerance during subsequent exposure to salt stress. This was evidenced by plant growth, lipid peroxidation and antioxidative enzymes measurements. In both leaves and roots the variations in lipid peroxidation and antioxidative enzymes (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, glutathione reductase, and catalase) activities of both acclimated and unacclimated plants, suggest that differences in the antioxidative enzyme activities may, at least in part, explain the increased tolerance of acclimated plants to salt stress, and that H₂O₂ metabolism is involved as signal in the processes of maize salt acclimation.

Key words: *Acclimation - antioxidative enzymes - hydrogen peroxide - lipid peroxidation - maize - oxidative stress - salt stress - Zea mays.*

Abbreviations: APX, ascorbate peroxidase; CAT, catalase; GPX, guaiacol peroxidase; GR, glutathione reductase; GSSG, oxidized glutathione; H₂O₂, hydrogen peroxide; LA, leaf area; MDA, malondialdehyde; NBT, nitro blue tetrazolium chloride; RDM, root dry mass; ROS, reactive oxygen species; SDM, shoot dry mass; SOD, superoxide dismutase.

1. Introduction

Cellular homeostasis is achieved by the coordinated action of many biochemical pathways. However, under suboptimal conditions stress different pathways can be affected, and their coupling, which makes cellular homeostasis possible, is disrupted (Rizhsky et al., 2002). This process is usually accompanied by the formation of reactive oxygen species (ROS) resulting from an increased flow of electrons from the disrupted pathways to the reduction of oxygen (Halliwell and Gutteridge, 1989; Noctor and Foyer, 1998; Asada, 1999; Dat et al., 2000; Mittler, 2002). ROS formation leads to changes in intracellular redox homeostasis (Bowler and Fluhr, 2000), and it is now widely accepted that redox signals are key regulators of plant metabolism, morphology and development (Foyer and Noctor, 2003).

The ROS hydrogen peroxide (H₂O₂) has generally been viewed as a toxic cellular metabolite. However, it is now clear that it may also function as a signal molecule in both plant and animal cells (Finkel, 2000; Neill et al., 2002b). The generation of H₂O₂ is increased in response to a wide variety of abiotic and biotic stresses, and some authors have suggested that H₂O₂ plays a dual role in plants: at low concentrations, it acts as a messenger molecule involved in acclimatory signaling, triggering tolerance against various abiotic stresses, and at

high concentrations it orchestrates programmed cell death (Prasad et al., 1994; Van Breusegem et al., 2001; Neill et al., 2002a; Vandenabeele et al., 2003). Thus, it appears likely that H_2O_2 accumulation in specific tissues, and in the appropriate quantities, may benefit plants by mediating plant acclimation and cross-tolerance to both biotic and abiotic stresses (Bowler and Fluhr, 2000).

Several studies have produced evidence for a signaling role for H_2O_2 (Foyer et al., 1997). The addition of H_2O_2 to plant tissues or its experimental generation has been demonstrated to act as a signal in the induction of gene expression of the enzymes catalase (CAT) (Prasad et al., 1994; Polidoros and Scandalios, 1999), ascorbate peroxidase (APX) (Van Breusegem et al., 2001), guaiacol peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) (Janda et al., 1999). Changes in H_2O_2 homeostasis also induces synthesis of heat shock proteins and activates the mitogen-activated protein kinase cascade (Kovtun et al., 2000; Van Breusegem et al., 2001). In addition, Desikan et al. (2001) using cDNA microarray technology identified 175 non-redundant expressed sequence tags that are regulated by H_2O_2 .

Endogenous H_2O_2 production has been shown to increase in response to chilling stress in maize seedlings, and exogenously applied H_2O_2 increased chilling stress tolerance. This increase in tolerance was partly due to an enhanced antioxidative system that prevents the accumulation of ROS during chilling stress (Prasad et al., 1994). Nodal potato explants subcultured from H_2O_2 -treated microplants (acclimated) were resistant to a 15-h heat shock at 42 °C (a normally lethal treatment) even after 4 weeks of treatment (Lopez-Delgado et al., 1998). H_2O_2 injection in *Arabidopsis* leaves led to protection from a subsequent excess light-induced photobleaching effect (Karpinski et al., 1999). Recently, important evidence that H_2O_2 can induce acclimation to salt and heat stresses was obtained with rice seedlings pre-treated with various levels of H_2O_2 (Uchida et al., 2002). However, it is not known if H_2O_2 pre-treatment also induces salt stress tolerance in maize plants.

Considering that changes in H_2O_2 homeostasis may be a pivotal signaling event of the acclimation phenomenon and a key component in the stress survival process, the aim of this study was to evaluate the effects of H_2O_2 pre-treatment on plant growth, lipid peroxidation and activity of antioxidative enzymes in leaves and roots of a salt-sensitive maize genotype, in order to better understand the physiological and biochemical mechanisms of salt acclimation in maize plants.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, growth and treatment conditions

Seeds of BR-5011, a salt-sensitive maize (*Zea mays* L.) genotype (Azevedo Neto et al., 2004), were sown in trays containing vermiculite and irrigated daily with distilled water. Four days from seedling emergence they were transferred to trays containing aerated half-strength Hoagland's nutrient solution. Three days later half of the plants were pre-treated with nutrient solution containing $1.0 \mu M H_2O_2$ for 2 days (acclimation treatment) while the other half remained in nutrient solution. Preliminary studies using various concentrations of H_2O_2 (from 0.1 to $1000 \mu M H_2O_2$) and two different times of pre-treatment (1 or 2 days) have shown that $1.0 \mu M H_2O_2$ for 2 days was closer to the optimum combination to acclimate the seedlings. The plants were then transferred to 3 L plastic pots containing full-strength nutrient solution with or without 100 mM NaCl . Therefore, the plants were submitted to four treatments: control (not pre-treated with H_2O_2 and not salt-stressed); unacclimated-stressed (not pre-treated with H_2O_2 and salt-stressed); acclimated-unstressed (pre-treated with H_2O_2 and not salt-stressed); and acclimated-stressed (pre-treated with H_2O_2 and salt-stressed). Addition of salt (25 mM per day) began on transplanting into plastic pots. The experiment was carried out under glasshouse conditions. The mean values of temperature, relative air humidity and photosynthetic active radiation (at noon) were $27 \text{ }^\circ\text{C}$, 65% and $1200 \mu\text{mol m}^{-2}$

s⁻¹, respectively. Plants were harvested just before pre-treatment (day 0), at the end of pre-treatment (before the start of salt additions - day 2), and at one (day 6), five (day 10) and ten (day 15) days after the end of salt additions. Plants from each treatment were separated into shoot and roots for dry mass (DM) determinations as well as leaf area measurements as described in Azevedo Neto et al. (2004). The first fully expanded leaf and the younger third of the root system were frozen in liquid nitrogen, lyophilized, ground to a powder and kept in a freezer (-25 °C) for further biochemical analyses.

2.2. Extract preparation

Lyophilized leaf (0.20 g) and root (0.15 g) powder were homogenized in a mortar and pestle with 4 mL of ice-cold extraction buffer (100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.1 mM EDTA). The homogenate was filtered through muslin cloth and centrifuged at 16,000 × g for 15 min. The supernatant fraction was used as crude extract for enzyme activity and lipid peroxidation assays. All operations were carried out at 4 °C.

2.3. Enzyme assays

Total superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) activity was determined by measuring its ability to inhibit the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium chloride (NBT), as described by Giannopolitis and Ries (1977). The reaction mixture (1.5 mL) contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 μM EDTA, 13 mM methionine, 75 μM NBT, 2 μM riboflavin and 50 μL enzyme extract. Riboflavin was added last and tubes were shaken and illuminated with a two 20-W fluorescent tubes. The reaction was allowed to proceed for 15 min after which the lights were switched off and the tubes covered with a black cloth. Absorbance of the reaction mixture was read at 560 nm. One unit of SOD activity

(U) was defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of the NBT photoreduction rate and the results expressed as U mg^{-1} of dry mass (DM).

Total CAT (EC 1.11.1.6) activity was measured according the method of Beers and Sizer (1952), with minor modifications. The reaction mixture (1.5 mL) consisted of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 μM EDTA (20 mM H_2O_2 and 50 μL enzyme extract. The reaction was started by addition of the extract. The decrease of H_2O_2 was monitored at 240 nm and quantified by its molar extinction coefficient ($36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the results expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ DM}$.

Total APX (EC 1.11.1.1) activity was assayed according to Nakano and Asada (1981). The reaction mixture (1.5 mL) contained 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), 0.1 μM EDTA, 0.5 mM ascorbate, 1.0 mM H_2O_2 and 50 μL enzyme extract. The reaction was started by addition of H_2O_2 and ascorbate oxidation measured at 290 nm for 1 min. Enzyme activity was quantified using the molar extinction coefficient for ascorbate ($2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the results expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ DM}$, taking into consideration that two mols ascorbate are required for reduction of one mol H_2O_2 (McKersie and Leshem, 1994).

Total GPX (EC 1.11.1.7) activity was determined as described by Urbanek et al. (1991) in a reaction mixture (2.0 mL) containing 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 μM EDTA, 5.0 mM guaiacol, 15.0 mM H_2O_2 and 50 μL enzyme extract. The reaction was started by addition of enzyme extract and the increase in absorbance recorded at 470 nm for 1 min. Enzyme activity was quantified by the amount of tetraguaiacol formed using its molar extinction coefficient ($26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The results were expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ DM}$ taking into consideration that 4 mols H_2O_2 are reduced to produce one mol tetraguaiacol (Plewa et al., 1991).

Total GR activity (EC 1.6.4.2) was assayed as described by Foyer and Halliwell (1976), with minor modifications. The reaction mixture (1.0 mL) consisted of 100 mM

phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 μM EDTA, 0.05 mM NADPH, 3.0 mM GSSG and 50 μL enzyme extract. The reaction was started by the addition of GSSG and the NADPH oxidation rate was monitored at 340 nm for 1.0 min. Enzyme activity was determined using the molar extinction coefficient for NADPH ($6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and expressed as $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ DM}$.

2.4. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by measuring the amount of malondialdehyde (MDA) produced by the thiobarbituric acid reaction as described by Heath and Packer (1968). The crude extract was mixed with the same volume of a 0.5% (w/v) thiobarbituric acid solution containing 20% (w/v) trichloroacetic acid. The mixture was heated at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min and then quickly cooled in an ice-bath. The mixture was centrifuged at $3\,000 \times g$ for 10 min and the absorbance of the supernatant was monitored at 532 and 600 nm. After subtracting the non-specific absorbance (600 nm), the MDA concentration was determined by its molar extinction coefficient ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the results expressed as $\mu\text{mol MDA g}^{-1} \text{ DM}$.

The experimental design was a completely randomized factorial, five (harvest times) \times two (H_2O_2 levels) \times two (salt levels) with five replicates. In the biochemical analyses, for each extract the absorbance was determined on duplicate assays. The data were expressed as the means \pm standard deviation.

3. Results

3.1. Plant growth

The time course of changes in shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM), and leaf area (LA) are given in Fig. 5.1. It may be observed that unacclimated-stressed plants had their

SDM, RDM and LA reduced when compared to the control treatment. These reductions were 52, 32 and 50% at day 10, and 45, 30 and 48% at day 15, respectively. However, the salt-induced growth inhibition decreased when the seedlings were pre-treated with H_2O_2 . When comparing acclimated-stressed with unacclimated-stressed plants it can be seen that there were increases in SDM, RDM and LA of 35, 26 and 23% at day 10, and 22, 15 and 24% at day 15, respectively. The data also show that the H_2O_2 pre-treatment by itself did not affect the plant growth in relation to control treatment.

3.2. Enzyme activity

The time course of total SOD activity in leaves showed a transient increase at the end of acclimation (day 2), and after day 6 it remained unchanged until the end of the experimental period (Fig. 5.2A). SOD activity in both acclimated-unstressed and acclimated-stressed plants was, respectively, 27 and 42% higher than in control or unacclimated-stressed plants. In roots, SOD activity in acclimated plants was 21% higher than in control plants at 2 days from the start of acclimation, reached a maximum at day 6 and then decreased up to day 10 in all treatments (Fig. 5.2B). Salt stress increased root SOD activity in both acclimated and unacclimated plants at the time of maximal activity (day 6), but this salt-induced effect appeared to be reverted at day 10. From day 10 up to the end of the experimental period the variations in enzyme activity show that neither salt stress nor the H_2O_2 pre-treatment had any significant effect on root SOD activity.

The time courses of total CAT, APX, GPX, and GR activities in leaves are shown in Fig. 5.3. CAT activity increased by 73% as a result of H_2O_2 pre-treatment at day 2. The enzyme activity in control plants showed a slight variation up to day 10, and then there was an increase up to the end of the experimental period. The unacclimated-stressed plants showed the same general pattern of the control plants. CAT activity in acclimated-unstressed plants

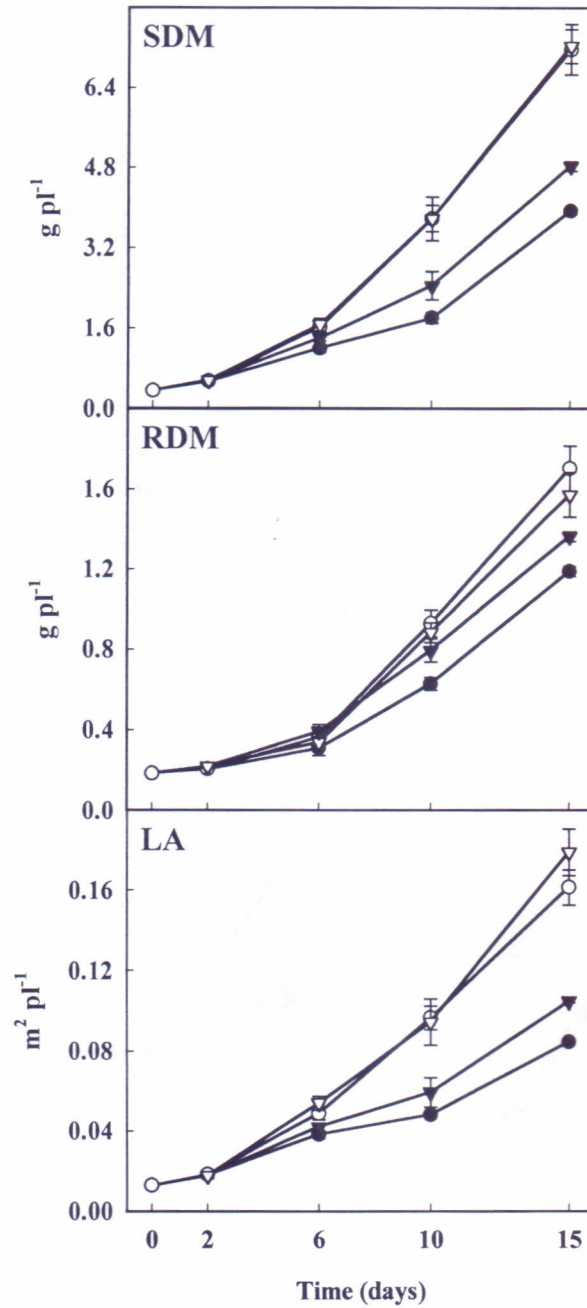


Figure 5.1. Time course of changes in shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM), and leaf area (LA) of maize plants. The plants were submitted to four treatments: control (○); unacclimated-stressed (●); acclimated-unstressed (▽); and acclimated-stressed (▼). Plants were harvested before pre-treatment (day 0), at the end of pre-treatment and just before the start of the salt additions (day 2), and one (day 6), five (day 10) and ten (day 15) days after the end of salt additions. Values indicate the mean \pm SD.

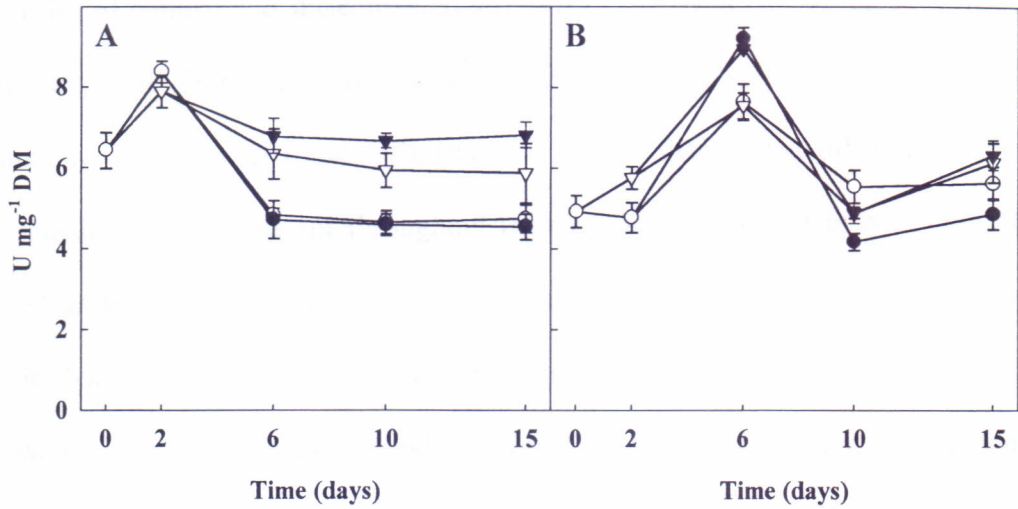


Figure 5.2. Time course of total SOD activity in leaves (A) and roots (B) of maize plants.

Additional details as in Fig. 5.1.

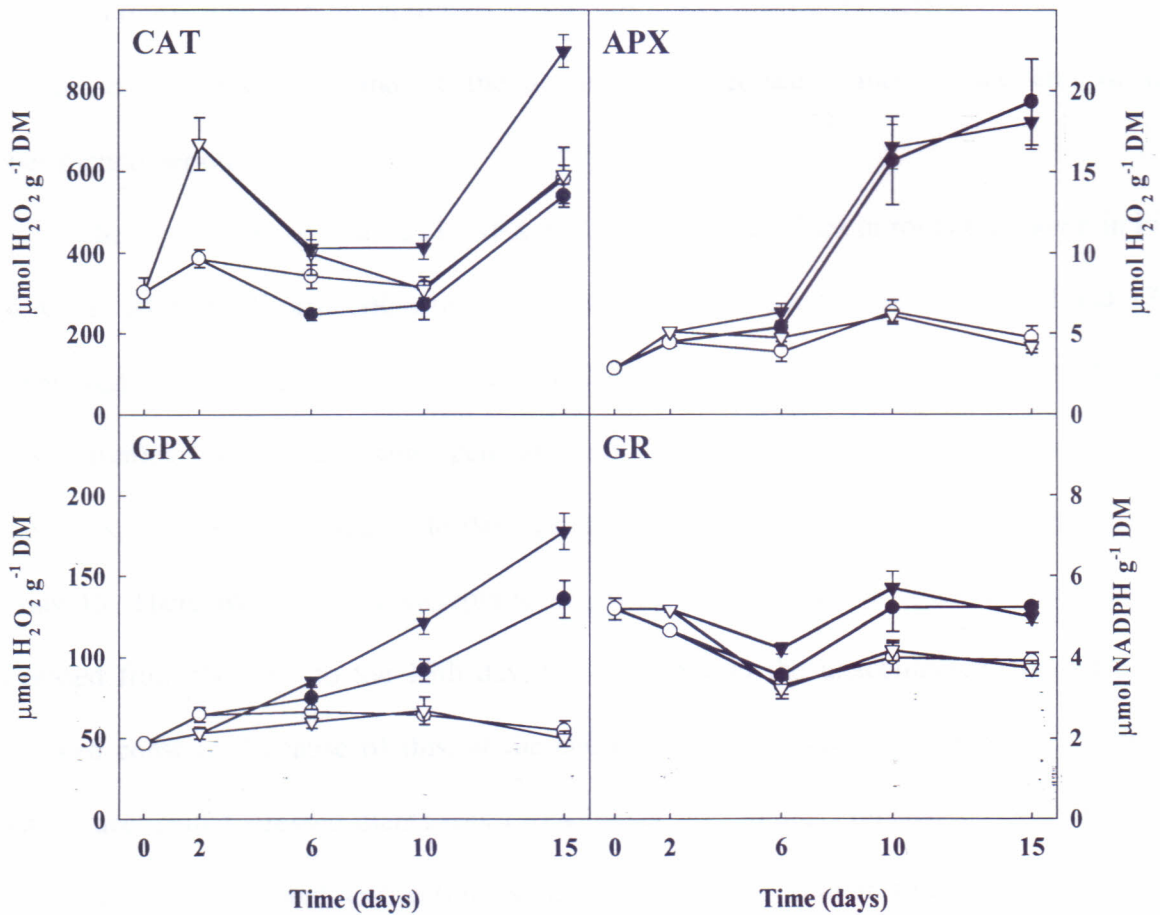


Figure 5.3. Time course of total CAT, APX, GPX, and GR activities in leaves of maize plants. Additional details as in Fig. 5.1.

did not differ of control and unacclimated-stressed plants from day 10 up to the end of the experimental period. During the same period the activity of the acclimated-stressed plants was approximately 42% (day 10) and 60% (day 15) higher than in the other treatments. APX activity remained fairly constant throughout the experimental period in both control and in acclimated-unstressed plants. However, salt stress induced a marked increase in the APX activity in both acclimated and unacclimated plants. The salt-induced increases in APX activity were nearly 150% at day 10 and 290% at day 15, when compared to both control and acclimated-unstressed plants. Salt stress also induced increase in GPX activity, either in acclimated or unacclimated plants, however this effect was more conspicuous in acclimated ones. GR activity slightly decreased in all treatments up to day 6 from the start of the H₂O₂ pre-treatment. During the latter part of the experimental period GR followed the same pattern as APX activity. The enzyme activities in the salt stress treatments were about 35% higher than those of the control and of the acclimated-unstressed plants, at the end of the experimental period.

The time course of total CAT, APX, GPX, and GR activities in roots are shown in Fig. 5.4. CAT, APX, GPX, and GR activities in the acclimated plants were 70, 26, 22 and 17% higher than in control plants, respectively, at 2 days after the start of acclimation. CAT and GPX activities followed the same general trend throughout the experimental period in all treatments, i.e., they increased up to day 6, remained fairly constant at day 10, and increased at day 15. There was only one exception, i.e., while the enzyme activities in all treatments increased from the 10th to the 15th day, CAT activity in the unacclimated-stressed plants remained constant. Because of this, at the end of the experimental period, CAT activity in roots of acclimated-stressed plants was 170% higher than in unacclimated-stressed ones. The time course of APX and GR activities in roots followed similar trends, and substantial differences were not observed among the treatments after day 6.

Comparing activities of H₂O₂-scavenging enzymes in leaves (Fig. 5.3) of salt-stressed plants at the end of the experimental period, CAT activity was 4.6- and 38.5-fold greater than GPX and APX activities, respectively. On the other hand, in roots, GPX activity (Fig. 5.4) in salt-stressed plants was 7.5- and 70-fold greater than CAT and APX activities, respectively. It is noteworthy that GPX activity was much higher than in roots than in leaves for both control and salt-stressed plants.

3.3. Lipid peroxidation

The time course of lipid peroxidation of both leaves and roots, measured as MDA content, is shown in Fig. 5.5. MDA content changed during the experimental period in leaves of control and acclimated-unstressed plants. In stressed treatments, the MDA content increased by nearly 32% at 10 days and 74% at 15 days, when compared to control and acclimated-unstressed plants, respectively (Fig. 5.5A). In roots, the amount of MDA in acclimated plants increased (about 34%) relative to control plants, at 2 days from the beginning of the H₂O₂ pre-treatment, and then decreased (Fig. 5.5B).

4. Discussion

Plant growth (SDM, RDM, and LA) was inhibited by salinity (Fig. 5.1). However, it was shown that H₂O₂ pre-treatment decreased the deleterious effects of salt stress on the growth of maize. The data suggest that H₂O₂ added to the growth solution for 2 days before the salt additions, led to a salt stress acclimation process. Although acclimation is considered a complex phenomenon, our results indicated that while salt stress could be detrimental to unacclimated plants, the previous application of a mild oxidative stress could be responsible for reducing the deleterious effects of salinity on plant growth.

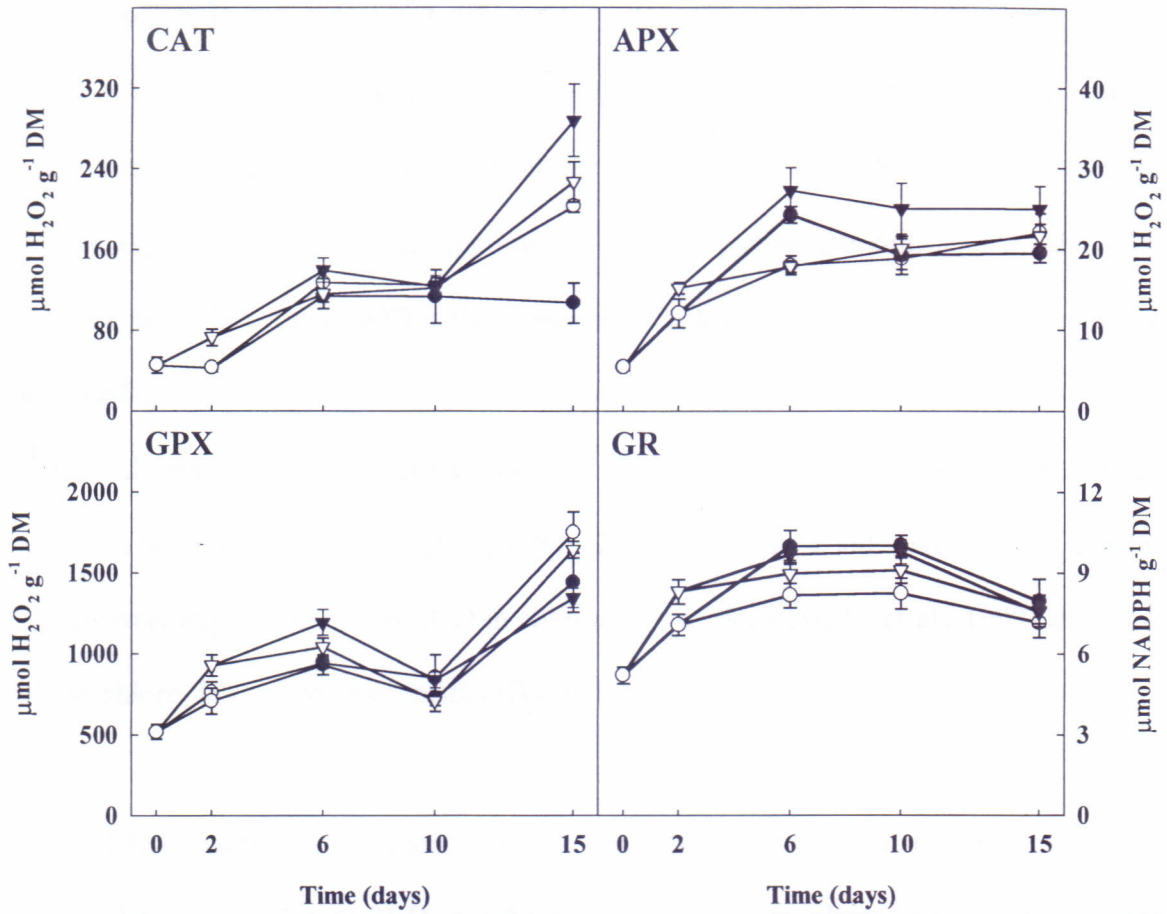


Figure 5.4. Time course of total CAT, APX, GPX, and GR activities in roots of maize plants. Additional details as in Fig. 5.1.

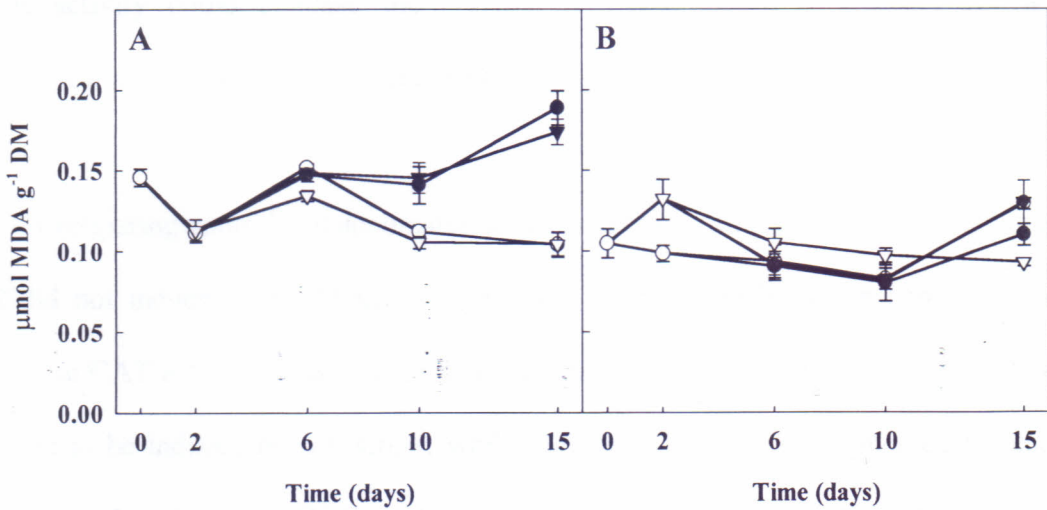


Figure 5.5. Time course of changes in total malondialdehyde content in leaves (A) and roots (B) of maize plants. Additional details as in Fig. 5.1.

Superoxide radicals ($O_2^{\bullet-}$) are toxic byproducts of oxidative metabolism and can interact with H_2O_2 to form highly reactive hydroxyl radicals (OH^{\bullet}), which are thought to be primarily responsible for oxygen toxicity in the cell (Bowler et al., 1992). The dismutation of $O_2^{\bullet-}$ into H_2O_2 and oxygen is an important step in protecting the cell, and is catalyzed by SOD. We have shown that SOD activity increased in leaves of both acclimated-stressed and acclimated-unstressed plants (Fig. 5.2), suggesting that H_2O_2 pre-treated plants had a better $O_2^{\bullet-}$ radical scavenging ability. It has been shown that salt tolerance is directly related to the increase in SOD activity (Gosset et al., 1994; Hernández et al., 2000; Shalata et al., 2001). In addition, over expression of Mn-SOD in chloroplasts of rice (Tanaka et al., 1999) and Cu/Zn-SOD in chloroplasts of tobacco plants (Badawi et al., 2004) produced enhanced tolerance to salt stress.

SOD initiates detoxification of $O_2^{\bullet-}$ by forming H_2O_2 , which also being toxic must be eliminated by conversion to H_2O in subsequent reactions. In plants, a number of enzymes regulate H_2O_2 intracellular levels, but CAT, APX, and GPX are considered the most important (McKersie and Leshem, 1994; Noctor and Foyer, 1998). GR also plays a key role in oxidative stress by converting the GSSG into reduced glutathione (GSH). The elevated levels of GR activity could increase the GSH/GSSG ratio, which is required for ascorbate regeneration and activation of several CO_2 fixing enzymes in the chloroplasts (Crawford et al., 2000).

Comparing control and acclimated unstressed plants it may be seen that acclimation by itself did not induce CAT, APX, GPX, and GR activities in leaves, except for a transient increase in CAT activity at day 2 (Fig. 5.3). In addition, high leaf APX and leaf GR activities appeared to be induced by salt stress, while high leaf CAT activity appeared to result from H_2O_2 -induced acclimation. On the other hand, enhancement of leaf GPX activity appeared to be correlated with both salt stress and H_2O_2 -induced acclimation.

In roots, the activities of all antioxidative enzymes were stimulated by H_2O_2 pre-treatment at day 2 (Fig. 5.4). In addition, root CAT activity at day 15 was reduced in unacclimated-stressed and increased in acclimated-stressed, when compared to control plants. Our data suggest that H_2O_2 pre-treatment could directly or indirectly activate antioxidative enzymes during salt stress, leading to a higher ability to withstand salt-induced effects. The results also suggest a general adaptive defense response of the root system to H_2O_2 -imposed oxidative stress (Liang et al., 2003), considering that the root was the first organ directly exposed to hydrogen peroxide.

It is noteworthy that the enhancement in leaf SOD activity of acclimated-stressed plants (Fig. 5.2A) was accompanied by an increase in leaf CAT, APX, GPX, and GR activities (Fig. 5.3), indicating that in stressed plants the H_2O_2 scavenging mechanism was more effective in acclimated than in unacclimated plants. Thus, the results suggests that CAT, APX and GPX activities coordinated with SOD activity may play a central protective role in the $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 scavenging process (Mittova et al., 2002; Liang et al., 2003; Badawi et al., 2004) and the active involvement of these enzymes is related, at least in part, to salt-induced oxidative stress tolerance in maize plants.

In the present study CAT and GPX were, respectively, the H_2O_2 scavenging enzymes with greater catalytic activity in leaves and roots irrespective of the treatment. Therefore, it could be hypothesized that CAT is the most important among the H_2O_2 scavenging enzymes in leaves, while the non-specific peroxidase (GPX) seems to play a key role in roots. The observation that CAT was the most upregulated enzyme in both leaves (73%) and roots (70%) at the end of acclimation (day 2) is an additional support to above conclusion. It also indicates that CAT appears to be the most important antioxidative enzyme for overcoming acclimation-imposed oxidative stress (Prasad et al., 1994).

Salt stress is known to result in extensive lipid peroxidation, which has often been used as indicator of salt-induced oxidative membrane damages (Hernández and Almansa, 2002). Our results showed that MDA content increased in salt-stressed leaves of both acclimated and unacclimated plants, but was practically unaffected in roots (Fig. 5.5). Although some results correlating lipid peroxidation to antioxidative system activity have been reported (Hernández and Almansa, 2002; Liang et al., 2003), the observation that lipid peroxidation in leaves of acclimated-stressed plants was not reduced by acclimation-induced upregulation of the antioxidative system is contrary to this hypothesis. In acclimated roots, the increase of MDA content at day 2, in spite of the increase in all antioxidative enzyme activities, further supports the above results. Our data also show that plant growth was not correlated to lipid peroxidation under salt stress conditions, since the growth of acclimated-stressed plants was greater than in unacclimated-stressed plants.

Our results show that H_2O_2 pre-treatment under normal growth conditions enhanced salt tolerance in the salt-sensitive maize genotype, and that differences in the antioxidative enzyme activities may, at least in part, explain the increased tolerance of acclimated plants to salt stress. Additional evidence is provided here that H_2O_2 metabolism is involved as signal in the processes of maize salt acclimation. Other studies have shown evidence for a signaling role of H_2O_2 , i.e. the addition of H_2O_2 to maize seedlings before cold treatment increased their chilling tolerance (Prasad et al., 1994), and provided some protection against both heat and salt stress conditions in rice (Uchida et al., 2002). Similarly, exogenous H_2O_2 treatments simultaneously enhanced multi-resistance to heat, chilling, drought and salt stresses in maize seedlings (Gong et al., 2001). Because many stress conditions cause cellular redox imbalances it has been proposed that oxidative stress defense responses might be a central component

mediating cross-tolerance (Bowler et al., 1992), that is, previous exposure to one stress can induce tolerance to the same or to a different kind of stress exposure (Bowler and Fluhr, 2000). Thus, plants could make use of common pathways and components in the stress-response relationship (Pastori and Foyer, 2002).

Acknowledgements: We thank Dr Ladaslav Sodek for reviewing the English text, and acknowledge the financial support given by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

5. References

- Aroca R, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M (2003) Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. *Physiol Plant* 117: 540-549
- Asada, K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639
- Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Lacerda CF, Silva JV, Costa PHA, Gomes-Filho E (2004) Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Braz J Plant Physiol* 16: 31-38
- Badawi, GH, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Naoyoshi K, Tanaka K, Tanaka K (2004) Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Sci* 166: 919-928
- Beers Jr RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195: 133-140

- Bowler C, Fluhr R (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci* 5: 241-246
- Bowler, C, Van Montagu, M, Inzé, D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 83-116
- Burke JJ, Gamble PE, Hatfield JL, Quisenberry JE (1985) Plant morphological and biochemical responses to field water deficit. I. Responses of glutathione reductase activity and paraquat sensitivity. *Plant Physiol* 79: 415-419
- Crawford NM, Kahn ML, Leustek T, Long SR (2000) Nitrogen and Sulfur. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, (ed) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. ASPP, Rockville pp 786-849
- Dat J, Vandenameele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegen F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779-795
- Desikan R, Mackerness SA-H-, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 127: 159-172
- Finkel T (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 476: 52-54
- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JE, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* 100: 241-254
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119: 355-364
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59: 309-314

- Gong M, Chen B, Li Z-G, Guo L-H (2001) Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *J Plant Physiol* 158: 1125-1130
- Gosset DR, Millhollon EP, Lucas MC (1994) Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci* 34: 706-714
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed.. Clarendon Press, Oxford
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125: 189-198
- Hernández JA, Almansa MS (2002) Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiol Plant* 115: 251-257
- Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux P, Sevilla F (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environ* 23: 853-862
- Janda T, Szalai G, Tari I, Páldi E (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208: 175-180
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654-657
- Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Shenn J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2940-2945
- Liang Y, Chen Q, Liu Q, Zhang W, Ding R (2003) Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Plant Physiol* 160: 1157-1164

- Lopez-Delgado H, Dat JF, Foyer CH, Scott IM (1998) Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J Exp Bot* 49: 713-720
- Malan C, Greyling MM, Gressel J (1990) Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Sci* 69: 157-166
- McKersie BD, Leshem YY (1994) Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishes, Dordrecht
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 9: 405-410
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol Plant* 115: 393-400
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2002a) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 388-395
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst R.D, Hancock JT (2002b) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53: 1237-1247
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279
- Pastori GM, Foyer CH (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol* 129: 460-468

- Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Res* 247: 57-64
- Polidoros A, Scandalios J (1999) Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione-S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant* 106: 112-120
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74
- Rabinowich HD, Fridovich I (1985) Growth of *Chlorella sorokiniana* in the presence of sulfite elevates cell content of superoxide dismutase and imparts resistance towards paraquat. *Planta* 164: 524-528
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130: 1143-1151
- Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol Plant* 112: 487-494
- Sharma YK, Leon J, Raskin I, Davis KR (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 5099-5104
- Tanaka Y, Hibino T, Hayashi Y, Tanaka A, Kishitani S, Takabe T, Yokota S, Takabe T (1999) Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondria Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Sci* 148: 131-138
- Urbanek H, Kuzniak-Gebarska E, Herka K (1991) Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Phys Plant* 13: 43-50

- Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci* 163: 515-523
- Van Breusegem F, Vranová E, Dat J.F, Inzé D (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 161: 405-414
- Vandenabeele S, Van Der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Boonefaes T, Morsa S, Rottiers P, Slooten L, Van Montagu M, Zabeau M, Inzé D, Van Breusegem F (2003) A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 23: 16113-16118

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Muitas revisões e muitos artigos científicos têm tentado estabelecer uma correlação entre o acúmulo de solutos (inorgânicos e orgânicos) e a tolerância das plantas ao estresse salino. Essa relação tem sido, na maioria dos casos, sugerida pelo simples fato dos teores destes solutos aumentarem quando uma espécie, ou genótipo, é submetida ao estresse. Em contraste, outros trabalhos têm demonstrado que o maior acúmulo de solutos em um genótipo que apresente melhor desempenho em ambiente salino não significa, necessariamente, que haja uma relação direta entre este acúmulo e a tolerância ao estresse. A maioria dos resultados conflitantes encontrados na literatura pode estar relacionada a fatores intrínsecos da planta (genótipo, órgão ou tecido analisado e estágio de desenvolvimento), fatores do estresse (tipo de salinidade, intensidade, duração e forma de aplicação do estresse) e fatores ambientais (luz, temperatura, umidade relativa do ar e sistema de cultivo), bem como das inúmeras interações entre eles (Cramer et al., 1994; Bray et al., 2000).

Neste trabalho, os dois genótipos estudados não diferiram entre si quanto aos aumentos nos teores de Na^+ nas folhas das plantas estressadas com NaCl, entretanto nas raízes do genótipo tolerante (BR5033), o teor de Na^+ aumentou mais do que no sensível (BR5011). Com base nos teores de Na^+ e no conteúdo de água, também foi estimado que as concentrações desse íon, em ambos os genótipos, foram maiores que 100 mM, a qual é considerada o limite máximo tolerado pelas enzimas citosólicas em células adaptadas ou não ao NaCl (Binzel et al., 1985). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os genótipos quanto ao acúmulo de K^+ nas folhas, nas raízes o conteúdo deste íon não foi afetado pelo estresse no genótipo tolerante, mas diminuiu significativamente no sensível. Os dados relativos ao acúmulo de íons inorgânicos, sugerem que o BR5033 apresentou uma maior capacidade para reter Na^+ na raiz do que o BR5011 (Greenway & Munns, 1980; Boursier & Läuchli, 1990) sendo, possivelmente, o genótipo mais eficiente no processo de exclusão do Na^+ presente no citoplasma (Azevedo Neto & Tabosa, 2000). Os dados também

sugerem que mudanças metabólicas resultantes do desequilíbrio nutricional ou da toxicidade iônica nas raízes podem ter contribuído, ao menos em parte, para a maior inibição do crescimento observada no genótipo sensível (BR5011), conforme também observado em outras espécies (Prisco, 1980; Munns, 2002).

Com relação aos solutos orgânicos, o teor de carboidratos solúveis e N-aminossolúveis nas folhas de ambos os genótipos não permitiu discriminar os caracteres de tolerância e sensibilidade ao estresse salino entre eles. Em contraste, o acúmulo destes compostos nas raízes das plantas sob estresse foi maior no genótipo tolerante do que no sensível, apresentando correlação altamente significativa com as taxas de crescimento relativo e de assimilação líquida. A redução no conteúdo de carboidratos solúveis no genótipo sensível pode ter sido devida à inibição da fotossíntese líquida, reduzindo a quantidade de carbono fixado na parte aérea e transportada para as raízes (Richardson & McCree, 1985). Em adição, os menores acúmulos de solutos orgânicos e inorgânicos no BR5011 em condições de estresse pode ter diminuído a absorção de água pelas raízes e seu fluxo para a parte aérea, comprometendo o balanço hídrico neste genótipo.

Ainda com relação aos solutos orgânicos, o fracionamento de aminoácidos livres mostrou que a salinidade aumentou o teor da maioria dos aminoácidos nas folhas e raízes de ambos os genótipos. Analisando-se conjuntamente os dados relativos aos conteúdos de proteínas solúveis e de aminoácidos livres, os resultados sugerem que o aumento na síntese *de novo* foi o mecanismo predominante no acúmulo da maioria dos aminoácidos livres analisados. Os dados relativos ao fracionamento de aminoácidos também sugerem que prolina, treonina, arginina, serina, aspartato e glicina foram os aminoácidos livres que mais contribuíram para a redução do potencial osmótico celular nas folhas e raízes de ambos os genótipos estudados. Em conclusão, o maior acúmulo de solutos orgânicos, principalmente

nas raízes do genótipo tolerante (BR5033), como resultado do estresse salino, parece desempenhar um papel importante na tolerância deste genótipo ao estresse.

Um outro aspecto comum a todos os estresses ambientais é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e os radicais livres hidroxila (HO^\bullet) ou peridroxila (HO_2^\bullet). Assim, nesta última década, resultados de numerosos estudos têm indicado que a redução nos danos oxidativos e o aumento da tolerância aos estresses ambientais, incluindo o estresse salino, está freqüentemente correlacionado a sistemas antioxidativos (constitutivos ou induzidos) mais eficientes.

Neste trabalho foram estudadas as atividades de cinco enzimas do sistema antioxidativo, responsáveis pela remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Analisando-se conjuntamente os dados da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase não específica (GPX), foi observado que o aumento na atividade da SOD induzido pela salinidade também foi acompanhado por um aumento nas atividades da APX e da GPX, principalmente no BR5033, e de uma grande redução na atividade da CAT no BR5011. Os dados também mostraram que CAT e GPX tiveram uma atividade removedora do H_2O_2 muito maior do que a APX, tanto nas folhas como nas raízes.

Os resultados sugerem que o mecanismo removedor de superóxido e H_2O_2 no genótipo tolerante foi mais efetivo do que aquele no sensível, e que a atividade da SOD, coordenada com as atividades da CAT, APX e GPX, pode desempenhar um papel protetor importante nos processos de remoção de superóxido e H_2O_2 (Mittova et al., 2002; Liang et al., 2003; Badawi et al., 2004). Em adição, os dados indicaram que, nas folhas, a CAT foi a mais importante enzima removedora do H_2O_2 , enquanto nas raízes, este papel parece ser desempenhado pela

peroxidase não específica (GPX), o que também foi observado por outros autores (Gosset et al., 1994; Rout & Shaw, 2001; Sudhakar et al., 2001; Meloni et al., 2003; Liang et al., 2003).

Com relação à peroxidação dos lipídios, este trabalho mostrou que a salinidade não afetou o conteúdo de malondialdeído (MDA) nas folhas do genótipo BR5033, mas aumentou nas do BR5011, sugerindo que as plantas do primeiro são melhor protegidas do estresse oxidativo. Esta hipótese é suportada pela observação de que o sistema antioxidativo nas folhas do genótipo BR5033 foi mais ativado em resposta ao estresse salino que aquele do BR5011.

Em geral, a produção de H_2O_2 é aumentada em resposta a uma grande variedade de estresses bióticos e abióticos, e já está bem estabelecido que esta espécie química desempenha um papel duplo nas plantas: em baixas concentrações, atua como uma molécula mensageira envolvida na transdução de sinal, ativando a tolerância contra vários estresses abióticos e, em altas concentrações, ele ativa a morte programada da célula (Prasad et al., 1994; Van Breusegem et al., 2001; Neill et al., 2002a,b; Vandenabeele et al., 2003). Deste modo, é possível que o acúmulo de H_2O_2 , em tecidos específicos e em quantidades apropriadas, possa ser um fator chave mediando os fenômenos de aclimação e de tolerância cruzada, em que a exposição prévia da planta a um estresse pode induzir, respectivamente, tolerância à exposição subsequente ao mesmo ou a diferentes estresses (Bowler & Fluhr, 2000). Neste contexto, após alguns ensaios preliminares, foi conduzido um experimento objetivando avaliar o efeito da aplicação de um estresse oxidativo moderado (pré-tratamento com H_2O_2) sobre o crescimento, peroxidação dos lipídios e atividade de enzimas antioxidativas no genótipo de milho sensível ao estresse (BR5011). Neste experimento, demonstrou-se que o pré-tratamento com H_2O_2 reduziu os efeitos deletérios do estresse salino no crescimento das plantas, sugerindo que o pré-tratamento com H_2O_2 a 1 μM por dois dias levou a um processo de aclimação ao estresse salino. Com relação às enzimas antioxidativas, os dados mostraram que a atividade da SOD só aumentou nas folhas das plantas aclimatadas (estressadas ou não),

sugerindo que as plantas pré-tratadas tiveram uma maior habilidade para removerem o radical superóxido. Além disso, observou-se que esse aumento na atividade da SOD foi acompanhado por um aumento nas atividades das enzimas CAT, APX, GPX, indicando que o mecanismo removedor de H_2O_2 foi mais efetivo nas plantas aclimatadas do que nas não aclimatadas.

No que diz respeito à peroxidação dos lipídios, o conteúdo de MDA nas folhas das plantas estressadas não diminuiu pelo pré-tratamento com H_2O_2 , independentemente do aumento observado nas atividades enzimáticas. Dessa forma, nossos dados mostraram que, sob condições de estresse, o crescimento não se correlacionou com a peroxidação dos lipídios, haja vista que o crescimento das plantas aclimatadas foi maior do que o das não aclimatadas.

Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com H_2O_2 aumentou a tolerância à salinidade no genótipo estudado, o BR5011 (sensível), e que as diferenças nas atividades das enzimas antioxidativas podem, ao menos em parte, explicar o aumento da tolerância ao estresse salino nas plantas aclimatadas. Também fornecem evidências adicionais de que o metabolismo do H_2O_2 está envolvido no processo de aclimação do milho ao estresse salino.

Em síntese, o trabalho mostrou que o genótipo tolerante (BR5033) manteve níveis mais elevados de Na^+ e K^+ , carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e aminoácidos livres nas raízes, o que pode ter contribuído substancialmente para um balanço hídrico mais adequado da planta. O trabalho também mostrou que o estresse oxidativo induzido pela salinidade é um estresse secundário importante em plantas de milho e que a maior atividade das enzimas antioxidativas observadas nas folhas e raízes do genótipo tolerante em relação ao sensível, pode explicar, ao menos em parte, a maior tolerância do BR5033 ao estresse salino. Dessa forma, ficou patente neste trabalho o padrão multigênico das respostas das plantas à salinidade, as quais envolvem diversos aspectos relacionados com as homeostases iônica e osmótica, bem como com o processo de desintoxicação celular. Em adição, o trabalho

evidenciou a importância dos estudos com plantas e não com órgãos e tecidos específicos, além de ter demonstrado a importância de se considerar o tempo de exposição das plantas ao agente estressor para obtenção de conclusões consistentes em estudos de fisiologia e bioquímica das plantas sob estresse salino.

Referências

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

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

BINZEL, M. L.; HASEGAWA, P. M.; HANDA, A. K.; BRESSAN, R. A. Adaptation of tobacco cells to NaCl. **Plant Physiology**, v. 79, p. 118-125, 1985.

BOURSIER, P.; LÄUCHLI, A. Growth responses and mineral nutrient relations of salt-stressed sorghum. **Crop Science**, v. 30, p. 1226-1233, 1990.

BOWLER C.; FLUHR R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 241-246, 2000.

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

CRAMER, G. R.; ALBERICO, G. J.; SCHMIDT, C. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 21, p. 675-692, 1994.

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

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-90, 1980.

LIANG, Y.; CHEN, Q.; LIU, Q.; ZHANG, W.; DING, R. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1157-1164, 2003.

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

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

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 239-250, 2002.

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

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1237-1247, 2002b.

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

PRISCO, J. T. Alguns aspectos da fisiologia do "stress" salino. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, p. 85-94, 1980.

RICHARDSON, S. G.; MCCREE, K. J. Carbon balance and water relations of sorghum exposed to salt and water stress. **Plant Physiology**, v. 79, p. 1015-1020, 1985.

ROUT, N. P.; SHAW, B. P. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. **Plant Science**, v. 160, p. 415-423, 2001.

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

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

VANDENABEELE, S.; VAN DER KELEN, K.; DAT, J.; GADJEV, I.; BOONEFAES, T.; MORSA, S.; ROTTIERS, P.; SLOOTEN, L.; VAN MONTAGU, M.; ZABEAU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 23, p. 16113-16118, 2003.