

**RICARDO MARQUES MONTANARI**

**ATIVIDADE RESPIRATÓRIA E METABOLISMO  
ANTIOXIDATIVO EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE MILHO  
(*Zea mays* L.) SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M764a  
2006

Montanari, Ricardo Marques, 1979-  
Atividade respiratória e metabolismo antioxidativo em  
raízes de plântulas de milho (*Zea mays* L.) submetidas ao  
estresse salino / Ricardo Marques Montanari. – Viçosa :  
UFV, 2006.  
xviii, 56f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marco Aurélio Pedron e Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 47-56.

1. Milho - Efeito do sal. 2. Stress oxidativo. 3. Milho -  
Metabolismo. 4. Mitocôndria. 5. Fisiologia vegetal.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.1591

**RICARDO MARQUES MONTANARI**

**ATIVIDADE RESPIRATÓRIA E METABOLISMO ANTIOXIDATIVO  
EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE MILHO (*Zea mays* L.)  
SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia Vegetal para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada em: 28 de junho de 2006

---

Prof<sup>ª</sup>. Andréa Miyasaka de Almeida

---

Prof. Paulo Henrique Pereira Peixoto

---

Prof. Marco Antonio Oliva Cano  
(Co-orientador)

---

Prof. José Cambraia  
(Co-orientador)

---

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva  
(Orientador)

*Aos meus pais, Maria José e Sebastião.  
Exemplos de honestidade, integridade e  
discernimento. Meus primeiros e eternos  
professores.*

***MINHA HOMENAGEM***

*Ao meu irmão, Rodrigo, pelo  
companheirismo incondicional.*

***OFEREÇO E DEDICO***

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela ajuda financeira.

Ao Professor Marco Aurélio Pedron e Silva, pela orientação, dedicação e compreensão durante este período, e por seu exemplo de profissionalismo e competência.

Aos Professores Marco Antonio Oliva Cano, José Cambraia e Fabio Murilo da Matta, pelo aconselhamento e pela ajuda indispensáveis e fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos amigos e companheiros de bancada Abelardo, Daniel e Marcio, que compartilharam os dias, noites e madrugadas de trabalho.

Aos amigos Cleberson e Élcio, pela extraordinária demonstração de boa vontade e pela ajuda imprescindível num momento crucial.

Aos funcionários, Carlos Raimundo, Geraldo (Marreco), Antônio Cordeiro, José Antonio, Reginaldo, Oswaldo, Beringh, Monteiro, Maria Mercês, Beth e Cássia, sem os quais nada seria realizado.

Aos professores Paulo Henrique Pereira Peixoto e Andréa Miyasaka de Almeida, além da comissão orientadora, pela participação amistosa na banca de defesa e por suas críticas, sugestões e correções de enorme contribuição para a melhoria do texto e de meu aprendizado.

Aos professores Geraldo Luiz Gonçalves Soares, Antônio Daniel Fernandes Coelho e Magda Narciso Leite, pela confiança em minha capacidade e pelo apoio e incentivo de minha busca por meu ideal.

Aos amigos Eduardo, Leonardo, Fernanda, Letícia, Fabrício, Dai, Cândida, Giovani, Eber e Luciana, pelos momentos de descontração e boa convivência e, principalmente, pela amizade gratuita.

À Lilian, pelo carinho e aconchego e por ser minha família aqui.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio constante e pelos ensinamentos de vida.

## CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE QUADROS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xviii
1 – INTRODUÇÃO .....	1
2 – OBJETIVOS .....	7
3 – MATERIAL E MÉTODOS .....	8
3.1 – Condições de Cultivo .....	8
3.2 – Avaliação de Cultivares Comerciais de Milho quanto à Tolerância ao Estresse Salino .....	9
3.2.1 – Ganho de Massa Seca .....	9
3.2.2 – Avaliação de Danos à Plasmalema .....	10
3.3 – Avaliação da Peroxidação de Lipídeos, Atividades Enzimáticas e Teores de Ascorbato .....	10

3.3.1 – Avaliação da Peroxidação de Lipídeos .....	11
3.3.2 – Dismutase do Superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) .....	11
3.3.3 – Catalases (CAT, EC 1.11.1.6).....	12
3.3.4 – Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.1.11).....	13
3.3.5 – Redutase da Glutathione (GR, EC 1.6.4.2).....	13
3.3.6 – Determinação dos Teores de Ascorbato e Desidroascorbato .....	14
3.4 – Isolamento e Purificação de Mitocôndrias de Raízes .....	15
3.5 – Avaliação da Atividade Respiratória em Mitocôndrias Purificadas .....	16
3.6 – Avaliação do Potencial Transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) em Mitocôndrias Purificadas.....	16
3.7 – Dosagem de Proteínas.....	17
3.8 – Análises Estatísticas.....	17
4 – RESULTADOS.....	18
4.1 – Seleção de Cultivares de Milho quanto à Tolerância ao Estresse Salino.....	18
4.1.1 – Ganho de Massa Seca.....	18
4.1.2 – Extravasamento Relativo de Eletrólitos.....	22
4.2 – Influência do Estresse Salino sobre Enzimas do Sistema Antioxidativo, Teores de Ascorbato e Peroxidação de Lipídeos nos Tecidos Radiculares .....	25
4.3 – Efeito do Estresse Salino sobre a Peroxidação de Lipídeos, Atividade Respiratória e Potencial Elétrico Transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) em Mitocôndrias isoladas de Raízes.....	31

5 – DISCUSSÃO.....	38
5.1 – Tolerância à Salinidade em Cultivares Comerciais de Milho .....	38
5.2 – Enzimas Antioxidativas, Teores de Ascorbato e Peroxidação de Lipídeos no Sistema Radicular.....	39
5.3 – Atividade Respiratória, Potencial Elétrico Transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) e Peroxidação de Lipídeos em Mitocôndrias Isoladas de Raízes .....	43
6 – CONCLUSÕES.....	46
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ganho de massa seca da parte aérea de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de NaCl, após sete dias de tratamento ..... **20**
- Figura 2 – Ganho de massa seca do sistema radicular de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de NaCl, após sete dias de tratamento ..... **21**
- Figura 3 – Extravasamento relativo de eletrólitos em folhas de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de NaCl, após sete dias de tratamento ..... **23**
- Figura 4 – Extravasamento relativo de eletrólitos em raízes de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de NaCl, após sete dias de tratamento ..... **24**

Figura 5 –	Atividade das dismutases do superóxido (SOD) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento .....	<b>25</b>
Figura 6 –	Atividade de catalases (CAT) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento .....	<b>26</b>
Figura 7 –	Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento .....	<b>27</b>
Figura 8 –	Atividade da redutase da glutaciona (GR) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento .....	<b>28</b>
Figura 9 –	Peroxidação de lipídeos em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento.....	<b>30</b>
Figura 10 –	Peroxidação de lipídeos em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho. As plântulas foram submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, durante sete dias .....	<b>31</b>
Figura 11 –	Consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento .....	<b>32</b>

- Figura 12 – **(A)** Coeficiente de controle respiratório e **(B)** razão ADP/O em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento..... **34**
- Figura 13 – Consumo de oxigênio pelas vias da oxidase do citocromo *c* (Cit *c*) e da oxidase alternativa (AOX) e consumo residual de oxigênio em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento ..... **35**
- Figura 14 – Variação do potencial elétrico transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de milho das cultivares AGN 3150 **(A)** e BR 106 **(B)**. As plântulas foram submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, durante sete dias ..... **37**

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Equações de regressão para o ganho de massa seca da parte aérea de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero, 50 e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento ..... **20**
- Quadro 2 – Equações de regressão para o ganho de massa seca do sistema radicular de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero, 50 e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento ..... **21**
- Quadro 3 – Equações de regressão para o extravasamento relativo de eletrólitos em folhas de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero, 50 e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento ..... **23**
- Quadro 4 – Equações de regressão para o extravasamento relativo de eletrólitos em raízes de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero, 50 e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento ..... **24**

Quadro 5 – Teores de ascorbato reduzido (Asc), desidroascorbato (DHA), ascorbato total (Asc+DHA) e razão ascorbato reduzido/desidroascorbato (Asc/DHA) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas às concentrações de 0 e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento..... **29**

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina-5'-difosfato

ADP/O – Razão ADP/oxigênio

AOX – Oxidase alternativa

APX – Peroxidases do ascorbato (EC 1.11.1.11)

Asc – Ascorbato

ATP – Adenosina-5'-trifosfato

BSA – Albumina de soro bovino

CAT – Catalases (EC 1.11.1.6)

CV – Coeficiente de variação

CR – Coeficiente de controle respiratório

$\Delta\Psi$  - Potencial elétrico transmembrana

DHA – Desidroascorbato

DHAR – Redutase do desidroascorbato

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetra-acético

EGTA – Ácido etileno glicol-bis-( $\beta$ -aminoetil éter)-NN'-tetra acético

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GL - Galactono- $\gamma$ -lactona

GLDH – Desidrogenase da galactono- $\gamma$ -lactona

GR – Redutase da glutatona (EC 1.6.4.2)  
GSH – Glutatona, forma reduzida  
GSSH – Glutatona, forma oxidada  
HEPES – Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico  
MDA – Aldeído malônico  
MDHA – Monodesidroascorbato  
MDHA – Redutase do monodesidroascorbato  
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida  
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida  
NAD(P)H – NADH ou NADPH  
NBT – Azul de *p*-nitro tetrazólio  
PVPP – Polivinil-poli-pirrolidona  
ROIs – Intermediários reativos de oxigênio  
SHAM – Ácido salicil-hidroxâmico  
SOD – Dismutases do superóxido (EC 1.15.1.1)  
TBA – Ácido tiobarbitúrico  
TCA – Ácido tricloroacético  
TPP<sup>+</sup> – Cátion monovalente de tetrafenilfosfônio  
Tris – Tris (hidroximetil) aminometano  
UCP – Proteína desacopladora

## RESUMO

MONTANARI, Ricardo Marques, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2006. **Atividade respiratória e metabolismo antioxidativo em raízes de plântulas de milho (*Zea mays* L.) submetidas ao estresse salino.** Orientador: Marco Aurélio Pedron e Silva. Co-orientadores: José Cambraia, Marco Antonio Oliva Cano e Fábio Murilo da Matta.

A sensibilidade ao estresse salino foi avaliada em plântulas de milho (*Zea mays* L.) das cultivares AGN 3150, BR 106, BR 201, BR 206 e SHS 4040, cultivadas em solução nutritiva de Hoagland. Os tratamentos com 50 e 100 mM de NaCl reduziram a produção de biomassa e aumentaram o extravasamento relativo de eletrólitos nas raízes e nas partes aéreas de todas as cultivares estudadas. Porém, os maiores valores de redução no crescimento e de extravasamento de eletrólitos foram apresentados pela cultivar BR 106 e os menores valores observados na cultivar AGN 3150. Portanto, entre as cultivares avaliadas, estas duas foram consideradas, respectivamente, como a mais sensível e a mais tolerante ao estresse salino. Verificou-se, então, o efeito do tratamento com 100 mM de NaCl sobre alguns componentes do metabolismo antioxidativo e sobre a respiração mitocondrial nas raízes de plântulas dessas duas cultivares. A cultivar tolerante apresentou aumento nas atividades das enzimas dismutase

do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutathione (GR), bem como aumento na razão ascorbato/desidroascorbato. A cultivar sensível apresentou redução na atividade das catalases (CAT) e GR, e também da razão ascorbato/desidroascorbato. O grau de peroxidação de lipídeos aumentou nas raízes e nas mitocôndrias isoladas, apenas na cultivar sensível. Nas mitocôndrias isoladas da cultivar tolerante, o tratamento com NaCl resultou em aumento na taxa respiratória no estado 4 e na capacidade da rota alternativa. Além disso, houve redução nas razões ADP/O e de controle respiratório, indicando um menor grau de acoplamento, possivelmente resultante da maior atividade da oxidase alternativa (AOX) na cultivar tolerante. Na cultivar sensível, a atividade respiratória total e a razão ADP/O foram fortemente reduzidas, porém a participação percentual da rota alternativa não foi alterada. O tratamento com NaCl resultou em redução na atividade da proteína desacopladora (UCP) na cultivar tolerante e em aumento desta atividade na cultivar sensível. Pelos dados obtidos, a maior tolerância da cultivar AGN 3150 está relacionada à sua maior eficiência na remoção de intermediários reativos de oxigênio, além da maior possibilidade de desvio de elétrons pela sua rota alternativa na cadeia respiratória. Entretanto, a contribuição da UCP nos mecanismos de tolerância à salinidade dessa cultivar não foi evidenciada.

## ABSTRACT

MONTANARI, Ricardo Marques, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June 2006. **Respiration activity and antioxidative metabolism in roots of maize (*Zea mays* L.) seedlings submitted to salt stress.** Adviser: Marco Aurélio Pedron e Silva. Co-advisers: José Cambraia, Marco Antonio Oliva Cano and Fábio Murilo da Matta.

Tolerance to salt stress was studied in maize seedlings (*Zea mays* L.) cultivars AGN 3150, BR 106, BR 201, BR 206 and SHS 4040, grown in Hoagland's nutrient solution. Treatments with NaCl 50 and 100 mM led to a decrease in the biomass production and to an increase in the relative electrolyte leakage in the roots and shoots in all cultivars. However, the largest decrease in growth and electrolyte leakage were shown by cultivar BR 106 and the smallest ones by cultivar AGN 3150, lead them to be considered as the most sensitive and the most tolerant to salt stress, respectively. The effect of NaCl 100 mM was investigated by considering some components of the antioxidative metabolism and mitochondrial respiration in roots of the seedlings. The tolerant cultivar showed increased activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR), as well as increase in ascorbate/dehydroascorbate ratio. The sensitive cultivar showed reduction in catalases (CAT) and GR activities as well as in ascorbate/dehydroascorbate

ratio. The lipid peroxidation degree increased in roots and isolated mitochondria, only in the sensitive cultivar. In mitochondria isolated from the tolerant cultivar, NaCl treatment promoted an increase in the state 4 respiration rate and in the alternative pathway capacity. Additionally, salinity promoted a decrease in ADP/O and respiratory control ratios, indicating a lower coupling, likely due to an increase in alternative oxidase (AOX) activity. In sensitive cultivar, total respiration activity and the ADP/O ratio were strongly decreased, however the capacity of the alternative pathway was not altered. The NaCl treatment promoted decrease in the uncoupling protein (UCP) activity in the tolerant cultivar, but an increase it in the sensitive one occurred. These results suggest that the tolerant cultivar exhibits a larger efficiency in the reactive oxygen intermediates scavenging, as compared to the sensitive one. In addition, the high tolerance of cultivar AGN 3150 to the salt stress could be related to its high AOX capacity. A possible contribution of the UCP could not be confirmed from the results observed.

## 1 – INTRODUÇÃO

A alta salinidade no solo é responsável por um dos estresses ambientais mais conspícuos em todo o mundo e pode influenciar a distribuição natural das populações vegetais, bem como reduzir significativamente a produtividade de culturas agrícolas (Boyer, 1982). De acordo com dados da FAO (2000), 19,5% das áreas sob agricultura irrigada e 2,1% sob agricultura não irrigada, em todo o mundo, apresentam alta salinidade do solo.

Em condições naturais, a proximidade com o litoral ou as propriedades litológicas e edáficas do terreno podem ser responsáveis pela alta concentração de íons no solo (Resende *et al.*, 1995). Todavia, atividades antrópicas, como manejo inadequado da irrigação e fertilização na agricultura, também podem resultar num processo de salinização, principalmente em regiões áridas e semi-áridas onde o excesso de evapotranspiração remove a água pura da solução do solo, causando o aumento da concentração de solutos na rizosfera (Boyer, 1982).

A redução da produtividade agrícola em função da salinização pode levar ao abandono de áreas nobres para a agricultura. Neste contexto, a utilização de cultivares mais tolerantes à salinidade apresenta-se como uma alternativa viável para o reaproveitamento dessas áreas marginalizadas (Willadino *et al.*, 1999). Portanto, esforços em elucidar os mecanismos de aclimação das plantas ao estresse salino são de grande importância para

trabalhos de seleção e melhoramento de cultivares mais tolerantes à salinidade.

A resposta dos vegetais à salinidade é um fenômeno complexo, que envolve desde alterações metabólicas até modificações da morfologia e do desenvolvimento. Entretanto, o grau com que o estresse salino influencia a fisiologia das plantas é dependente de muitos fatores como a espécie vegetal, a cultivar, o tipo de salinidade, a intensidade e a duração do estresse, a umidade do solo e do ar e o estágio de desenvolvimento da planta, entre outros (Azevedo Neto & Tabosa, 2000). Segundo Katerji *et al.* (2003), a fase de estabelecimento das culturas pode ser dividida em três etapas, sendo elas a germinação, a emergência e o crescimento inicial das plântulas. Durante estas etapas, o solo se encontra mais exposto e a evaporação pode causar forte aumento da salinidade nas camadas mais superficiais do substrato. Conseqüentemente, as plântulas podem estar expostas a uma salinidade maior do que em estádios posteriores do crescimento (Van Hoorn, 1991).

Com relação à cultura do milho, diversos estudos relatam os efeitos deletérios do estresse salino sobre seu crescimento, independentemente da variável utilizada para avaliação (Izzo *et al.*, 1991; Alberico & Cramer, 1993; Saneoka *et al.*, 1995; Azevedo Neto *et al.*, 2004). O milho é considerado uma espécie moderadamente tolerante à salinidade (Katerji *et al.*, 2003) e sofre, como tal, redução progressiva do crescimento com o aumento da concentração de sais no solo. No entanto, verifica-se que diferentes cultivares comportam-se distintamente quando sujeitas à salinidade (Alberico & Cramer, 1993; Willadino *et al.*, 1999; Azevedo Neto *et al.*, 2004), o que possibilita a busca de cultivares mais tolerantes e o uso dessa espécie em estudos comparativos dos efeitos desse estresse sobre a fisiologia e bioquímica da planta. Adicionalmente, o milho apresenta alta produção de biomassa em curto período de tempo, além de possuir boa adaptação ao cultivo hidropônico, facilitando sua acomodação em pequeno espaço físico.

A inibição do crescimento das plantas pelo estresse salino pode ser causada, dentre outros fatores, pela redução do potencial osmótico e, ou o acúmulo excessivo de íons, o que pode induzir à toxicidade iônica,

desequilíbrio nutricional ou a ambos (Greenway & Munns, 1980). Assim, a sobrevivência em ambientes salinos pode ser relacionada aos processos de adaptação e aclimação, que envolvem absorção, transporte e distribuição de íons nos vários órgãos da planta e sua compartimentação dentro das células. Portanto, estratégias fisiológicas que conduzam a uma melhor seletividade da absorção iônica e exclusão de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  de tecidos mais ativos metabolicamente podem estar envolvidas com a tolerância das culturas ao estresse salino (Greenway & Munns, 1980). Esta exclusão pode ser efetuada por meio do acúmulo preferencial de íons em tecidos relativamente tolerantes da raiz ou da parte aérea (Azevedo Neto & Tabosa, 2000).

Sob condições de estresse salino existe um decréscimo na relação  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  da rizosfera, o qual afeta as propriedades da membrana plasmática, devido ao deslocamento, pelo  $\text{Na}^+$ , do  $\text{Ca}^{2+}$  associado à plasmalema, reduzindo sua seletividade (Cramer *et al.*, 1985). Isto causa perturbação na absorção de íons e na sua partição nas células e ao longo da planta, principalmente do íon  $\text{K}^+$ , além de favorecer o aumento de  $\text{Na}^+$  dentro da célula, o que acarreta alterações na atividade de enzimas, resultando em distúrbios metabólicos (Silva *et al.*, 2003). Logo, os antagonismos iônicos em ambientes salinos são usualmente seguidos por deficiências nutricionais e, conseqüentemente, a composição iônica no perfil da planta é um aspecto importante no que diz respeito à avaliação da tolerância ao estresse salino.

O ajustamento osmótico também tem sido considerado importante para a tolerância à seca e salinidade em plantas (Richardson & McCree, 1985). Este mecanismo promove a redução do potencial osmótico celular por meio do acúmulo líquido de solutos, os quais podem ser íons inorgânicos e, ou solutos orgânicos compatíveis, como carboidratos solúveis e aminoácidos, principalmente prolina (Hasegawa *et al.*, 2000). Deste modo, o ajustamento osmótico contribui para manutenção da absorção de água e da turgescência celular, interferindo em processos celulares, como abertura estomática e expansão celular (Serraj & Sinclair, 2002). Em adição ao seu papel nas relações hídricas da célula, o acúmulo de solutos orgânicos também pode contribuir para a manutenção da homeostase iônica, controle

do pH citoplasmático, remoção de radicais livres, estabilização de macromoléculas e organelas e como reservatório de carbono e nitrogênio para utilização após o estresse (Bray *et al.*, 2000).

Diante disto, observa-se que os componentes fisiológicos e bioquímicos relacionados com a homeostase iônica e osmótica têm sido os principais alvos dos estudos a respeito da tolerância à salinidade em plantas (Kafi *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003), inclusive ao nível molecular (Apse *et al.*, 1999; Xiong *et al.*, 2002; Zörb *et al.*, 2005). Por outro lado, assim como vários outros tipos de estresses ambientais, o estresse salino pode provocar o aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs), os quais podem causar sérios danos estruturais e ao metabolismo (Hernández *et al.*, 1993; Mittler, 2002). Deveras, intermediários reativos de oxigênio como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são produtos universais do metabolismo aeróbico (Scandalios, 1993). Em plantas, ROIs são geradas em níveis significantes por reações intrínsecas à fotossíntese, fotorrespiração, fosforilação oxidativa,  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e atividade de vários tipos de oxidases (Alscher *et al.*, 1997). Porém, em condições normais, a geração e a remoção de ROIs apresentam um balanço apropriado, o qual requer a coordenação eficiente de reações em diferentes compartimentos celulares e é governado por uma rede complexa de sistemas pro-oxidantes e antioxidantes (Foyer & Noctor, 2005). A falha no controle desta homeostase redox leva ao fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Foyer & Noctor, 2000).

O sistema antioxidante das plantas inclui tanto componentes não enzimáticos como ascorbato, glutatona e moléculas hidrofóbicas (tocoferol, carotenóides e xantofilas), como enzimas desintoxicantes que operam em diferentes organelas (Noctor & Foyer, 1998). Entre estas enzimas estão as dismutases do superóxido (SODs; EC 1.15.1.1), que catalisam a dismutação do  $O_2^{\bullet -}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Scandalios, 1993). Três classes de SODs têm sido identificadas, com base em seu cofator metálico. As FeSODs são encontradas somente em cloroplastos, MnSODs são encontradas principalmente em mitocôndrias e Cu/ZnSODs estão localizadas em

cloroplastos, citosol, apoplasto e peroxissomas (Bowler *et al.*, 1992). As principais enzimas de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de células fotossintetizantes são as catalases (CAT; EC 1.11.1.6), que convertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (Willekens *et al.*, 1997), e as peroxidases do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11), que usam o ascorbato como doador de elétrons para a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Asada, 1992). A peroxidase do ascorbato é parte do ciclo ascorbato-glutationa, o qual usa glutatona reduzida para regenerar ascorbato (Foyer & Halliwell, 1976), sendo a glutatona regenerada pela redutase da glutatona (GR; EC 1.6.4.2). O ciclo ascorbato-glutationa é o mais importante sistema de desintoxicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos cloroplastos, mas também tem sido identificado no citosol (Noctor & Foyer, 1998), peroxissomos e mitocôndrias (Jimenez *et al.*, 1997; Mittova *et al.*, 2004ab).

Os radicais superóxido produzidos durante a respiração mitocondrial podem prover um aporte considerável para a carga oxidativa apresentada pela célula vegetal como um todo, principalmente em condições de estresse (Møller 2001). Portanto, as mitocôndrias requerem um sistema antioxidante eficiente para prevenir a peroxidação de lipídeos e proteger as enzimas de danos oxidativos. Com efeito, mitocôndrias vegetais apresentam algumas vias alternativas que podem desempenhar um papel importante no controle da formação e remoção de ROIs. Estas incluem desidrogenases de NAD(P)H não bombeadoras de prótons que evitam o complexo I (Rasmusson *et al.*, 1998), uma oxidase alternativa (AOX) que aceita elétrons diretamente do “pool” de ubiquinol, sem a intervenção da oxidase do citocromo *c* (Maxwell *et al.* 1999), e a proteína desacopladora (UCP) que promove influxo de prótons para a matriz, reduzindo o gradiente eletroquímico (Vercesi *et al.*, 1995; Brandalise *et al.*, 2003). Estas vias alternativas permitem o desacoplamento do transporte de elétrons da produção de ATP, prevenindo uma super-redução da cadeia de transporte de elétrons que, caso contrário, poderia ocorrer em situações de maior restrição ao fluxo de elétrons (Day & Wiskich, 1995; Vanlerberghe & McIntosh, 1997).

Assim, em adição aos sistemas antioxidantes, o metabolismo mitocondrial também poderia estar relacionado com a capacidade de evitar,

reduzir ou reparar os danos celulares causados pelo desbalanço oxidativo. Ademais, diversos trabalhos têm sugerido tal envolvimento das mitocôndrias vegetais na tolerância ao estresse oxidativo induzido por tratamentos bióticos e abióticos (Møller, 2001; Mittler, 2002; Foyer & Noctor, 2003).

Considerando que o sistema radicular é normalmente o primeiro órgão exposto ao estresse salino, e que as raízes dependem das mitocôndrias para a maior parte de sua produção de energia celular, os prejuízos à função mitocondrial relacionados ao estresse salino são particularmente importantes para o sistema radicular. Ademais, alguns autores têm relatado o possível envolvimento da AOX (Jolivet *et al.*, 1990) e da UCP (Trono *et al.*, 2004) na resposta fisiológica ao estresse salino. Portanto, procurou-se investigar o efeito do estresse salino sobre as atividades respiratórias, envolvendo a AOX e a UCP, e sobre alguns componentes do metabolismo antioxidativo, em raízes de plântulas de milho submetidas ao estresse salino.

## **2 – OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivos verificar a tolerância à alta salinidade em plântulas de cinco cultivares comerciais de milho e analisar o efeito do estresse salino sobre o metabolismo antioxidativo e sobre a respiração de mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de milho de cultivares com tolerância diferencial à salinidade.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas as cultivares comerciais de milho (*Zea mays* L.) AGN 3150, BR 106, BR 201, BR 206 e SHS 4040. As sementes da cultivar AGN 3150 (híbrido triplo) foram adquiridas da empresa Agromen Sementes Agrícolas LTDA, das cultivares BR 106 (variedade), BR 201 e BR 206 (híbridos duplos) da empresa Riber® Sementes LTDA e da cultivar SHS 4040 (híbrido duplo) da empresa Santa Helena Sementes LTDA.

#### **3.1 – Condições de Cultivo**

Após a esterilização superficial em hipoclorito de sódio 0,2% (v/v) por 60 minutos, as sementes foram lavadas com água destilada, acondicionadas em cartuchos de papel absorvente embebidos em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) com um décimo da força iônica, e acondicionadas em câmara escura para germinação, com umidade relativa saturada e temperatura de  $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por três dias.

No terceiro dia após a semeadura, plântulas de tamanhos homogêneos foram transferidas para um sistema hidropônico contendo solução nutritiva de Hoagland, com metade da força iônica, e pH ajustado diariamente para 5,6. O sistema foi mantido em câmara de crescimento à

temperatura de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , densidade de fluxo de fótons de  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

A partir do quarto dia, exceto para o tratamento controle, os recipientes receberam a adição de 25 mM de NaCl, a cada 12 horas, até completar os tratamentos de 50 ou de 100 mM.

No sexto dia de cultivo, a solução dos recipientes foi trocada por solução de Hoagland completa, com a adição de zero, 50 ou 100 mM de NaCl, conforme os tratamentos.

No décimo dia as plantas foram coletadas e utilizadas para os ensaios analíticos.

### **3.2 – Avaliação de Cultivares Comerciais de Milho quanto à Tolerância ao Estresse Salino**

Inicialmente, as cinco cultivares mencionadas foram avaliadas quanto à sensibilidade ao estresse salino, tomando-se como parâmetros a produção de biomassa e a possível ocorrência de danos à membrana plasmática. Com base nesses parâmetros, foram selecionadas as duas cultivares com maior diferença na tolerância à salinidade, as quais foram utilizadas nos experimentos posteriores.

O experimento seguiu esquema fatorial (cinco cultivares de milho, AGN 3150, BR 106, BR 201, BR 206 e SHS 4040 e três níveis de NaCl, zero, 50 e 100 mM), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Cada unidade experimental consistiu de um vaso com 1,7 L de solução nutritiva, contendo 15 plantas.

#### **3.2.1 – Ganho de Massa Seca**

Foi avaliado o ganho de matéria seca total dos sistemas radiculares e das partes aéreas. No momento do transplântio, uma amostra de 125 plântulas de cada cultivar foi coletada. Os sistemas radiculares e as partes

aéreas foram separados, acondicionados em sacos de papel e colocados em estufa de ventilação forçada, à temperatura de 80°C, até atingirem massa constante para a mensuração da massa seca inicial. As plântulas das cinco cultivares foram coletadas após sete dias de tratamento e submetidas à secagem, conforme descrito acima, para mensuração da massa seca final. O ganho de massa seca foi obtido subtraindo-se da massa seca final a massa seca inicial.

### **3.2.2 – Avaliação de Danos à Plasmalema**

A integridade da plasmalema, nos sistemas radiculares e nas partes aéreas das plântulas das cinco cultivares, foi verificada pelo método de extravasamento de eletrólitos. Para tanto, 0,2 g de segmentos de raízes de cerca de 2 cm e 0,2 g de discos foliares com 0,75 cm de diâmetro foram coletados e lavados cinco vezes com água desmineralizada. Em seguida, foram imersos em 15 mL de água desmineralizada, em tubos com tampa rosqueada, onde permaneceram por 6 h à temperatura ambiente. A condutividade da solução externa foi então medida com condutivímetro Digimed, modelo DM31 (Santo Amaro, Brasil), e representou o extravasamento inicial de eletrólitos. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura de 90°C, por 2 h. Após o resfriamento, a condutividade da solução externa foi novamente medida e representou o extravasamento total de eletrólitos. O extravasamento relativo de eletrólitos foi determinado como a razão entre o extravasamento inicial e o total, expresso em porcentagem.

### **3.3 – Avaliação da Peroxidação de Lipídeos, Atividades Enzimáticas e Teores de Ascorbato**

Para as análises enzimáticas e de teores de metabólitos, os experimentos foram montados em esquema fatorial (duas cultivares de milho, AGN 3150 e BR 106, e dois níveis de NaCl, zero e 100 mM), no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Cada unidade

experimental foi constituída por um vaso com 1,7 L de solução nutritiva, contendo 15 plantas.

### **3.3.1 – Avaliação da Peroxidação de Lipídeos**

A peroxidação de lipídeos nos tecidos radiculares e em mitocôndrias isoladas de raízes foi avaliada pela quantificação do acúmulo de aldeído malônico (MDA), utilizando o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) (Cakmak & Horst, 1991). Para os tecidos radiculares, 0,1 g destes foram homogeneizados em almofariz de porcelana com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v). Para as mitocôndrias, 100 µL de suspensão mitocondrial foram adicionados a 900 µL de TCA 1% (p/v) e agitados vigorosamente, por 2 minutos. Os materiais assim obtidos foram centrifugados a 12.000 g, por 15 min. As etapas do processo de extração foram conduzidas entre zero e 4°C.

Em seguida, alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a tubos contendo 1,5 mL de solução de TBA 0,5% (p/v), preparado em TCA 20% (p/v). As amostras e o branco foram incubados a 95°C, por 2 horas, com agitação ocasional. Logo após, os tubos foram transferidos para banho de gelo, por 5 minutos, seguindo-se de centrifugação a 9.000 g, por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi mediada a 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. A estimativa da quantidade do complexo MDA-TBA foi obtida utilizando-se o coeficiente de absorvidade de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Heath & Packer, 1968).

### **3.3.2 – Dismutases do Superóxido (SOD; EC 1.15.1.1)**

O extrato enzimático foi obtido pela homogeneização de 0,3 g de tecido radicular com 15 mg de polivinil-poli-pirrolidona (PVPP) e 2 mL de tampão de extração, constituído de ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8. O

homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e centrifugado a 12.000 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática. As etapas do processo de extração foram executadas entre zero e 4°C.

A 1,5 mL da mistura de reação, constituída de metionina 13 mM, azul de *p*-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 100 nM e riboflavina 2 µM em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, foram adicionados 100 µL do extrato enzimático diluído em meio de extração (10% v/v). A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. A reação foi iniciada pelo acionamento da lâmpada e, após 5 min, interrompida pelo desligamento da mesma. A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pela determinação do incremento na absorbância a 560 nm (Giannopolitis & Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

### **3.3.3 – Catalases (CAT; EC 1.11.1.6)**

O extrato enzimático foi obtido pela homogeneização de 0,3 g de tecido radicular em 15 mg de PVPP e 2 mL de solução de extração, constituída de EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8. O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e centrifugado a 12.000 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática. As etapas do processo de extração foram executadas entre zero e 4°C.

A atividade da enzima foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático a 2,9 mL de meio de reação, constituído de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 25°C (Havir & McHale, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, medindo-se o decréscimo na absorbância a 240 nm, no intervalo de 10 a 40 segundos após o início da reação (Beers & Sizer, 1952). A atividade da CAT

foi calculada, utilizando-se, o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Anderson et al., 1995).

### **3.3.4 – Peroxidase do Ascorbato (APX; EC 1.11.1.11)**

O extrato enzimático foi obtido pela homogeneização de 0,3 g de tecido radicular em 15 mg de PVPP e 2 mL de solução de extração, constituída de ascorbato 1 mM e EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e centrifugado a 12.000 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática. Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas entre zero e 4°C.

A atividade de APX foi determinada de acordo com Nakano & Asada (1981), modificado por Koshiba (1993). A 2,8 ml da mistura de reação constituída de ascorbato 0,8 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, adicionou-se 100 µL do extrato enzimático. O ensaio foi iniciado pela adição de 100 µL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (concentração final 1,0 mM) à mistura de reação, sendo o decréscimo na absorbância a 290 nm registrado no intervalo de 15 a 45 segundos. A atividade da enzima foi determinada pela quantificação do ascorbato consumido, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Nakano & Asada, 1981).

### **3.3.5 – Redutase da Glutathiona (GR; EC 1.6.4.2)**

O extrato enzimático foi obtido pela homogeneização de 0,3 g de tecidos radiculares com 15 mg de PVPP e 2 mL de solução de extração, constituída de EDTA 1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, em tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5. O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e centrifugado a 12.000 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas entre zero e 4°C.

A atividade de GR foi determinada pela adição de 500 µL de extrato enzimático a 2,5 mL da mistura de reação constituída de glutatona oxidada 1 mM, NADPH 0,15 mM (preparado em tampão Tris-HCL 10 mM, pH 7,0), EDTA 1mM em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 (Carlberg & Mannervik, 1985). O ensaio foi iniciado pela adição do NADPH e o decréscimo na absorbância a 340 nm foi registrado no intervalo de 20 a 60 segundos. Para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar para o NADPH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Foyer & Halliwell, 1976)

### **3.3.6 – Determinação dos Teores de Ascorbato e Desidroascorbato**

Os teores de ascorbato reduzido (Asc) e desidroascorbato (DHA) foram determinados em 0,3 g de tecido radicular homogeneizado em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v), e centrifugado a 15.000 g, por 15 min (Arakawa et al., 1981).

Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi coletada e diluída em 150 µL de TCA 5%. O ascorbato total (Asc + DHA) foi determinado após redução do DHA pelo ditioneitol (DTT). A 250 µL do extrato diluído foram adicionados 125 µL de DTT 0,06% (p/v), preparado em etanol, e 125 µL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,2 M) + NaOH (1,2 M). A mistura foi incubada a 25°C, por 10 min. Subseqüentemente, acrescentaram-se à mistura 125 µL de etanol absoluto e os seguintes reagentes dissolvidos em etanol: 125 µL de N-etilmaleimida 0,24% (p/v), 125 µL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  4% (v/v), 250 µL de batofenantrolina 0,5% (p/v) e 150 µL de  $\text{FeCl}_3$  0,03% (p/v). Após agitação vigorosa, a mistura foi incubada a 30°C, por 90 min, e a reação foi paralisada, transferindo-se os tubos para banho de gelo. A absorbância da mistura foi medida a 534 nm. A concentração de Asc foi determinada por meio de uma curva de calibração, utilizando-se de concentrações conhecidas de ascorbato.

O ascorbato reduzido (Asc) foi determinado como descrito acima, sendo apenas o DTT omitido e substituído por etanol absoluto. DHA foi calculado pela diferença entre o ascorbato total e o ascorbato reduzido.

### **3.4 – Isolamento e Purificação de Mitocôndrias de Raízes**

Para os isolamentos de mitocôndrias, os experimentos foram montados em esquema fatorial (duas cultivares de milho, AGN 3150 e BR 106, e dois níveis de NaCl, zero e 100 mM), no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Cada unidade experimental foi composta por um vaso com 15 L de solução nutritiva, contendo 250 plantas.

O isolamento de mitocôndrias foi realizado como descrito por Day & Hanson (1977), com modificações. Aproximadamente 150 g de raízes foram fragmentados em 800 mL de meio de extração, constituído de sacarose 250 mM, albumina de soro bovino (BSA) 0,1% (p/v), ácido etileno glicol-bis-( $\beta$ -aminoetil éter)-NN'-tetra acético (EGTA) 1 mM, cisteína 4 mM e ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico (HEPES) 10 mM, pH 7,4. Em seguida, foram homogeneizados, com auxílio de triturador Politron (Kinematica AG Littau), por 3 segundos. O homogeneizado foi filtrado através de 4 camadas de gaze, o pH ajustado para 7,2, e submetido à centrifugação a 1.000 g, por 15 min. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, a 15.000 g, por 15 min, e o precipitado resultante suspenso em 3 mL de meio de suspensão, constituído de sacarose 250 mM e HEPES 10 mM, pH 7,2. A suspensão obtida foi submetida à centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll para a purificação de mitocôndrias, como descrito por Jackson et al. (1979). As soluções de Percoll foram preparadas com sacarose 250 mM, BSA 0,1% e tampão HEPES 10 mM, em pH 7,2, e dispostas em tubos formando um gradiente de três fases: fase inferior, Percoll 45%; fase intermediária, Percoll 21%; fase superior, Percoll 13,5%. A suspensão de mitocôndrias foi depositada cuidadosamente no topo das soluções de Percoll e o conjunto foi submetido à centrifugação, a 7.500 g, por 30 min. A fração de mitocôndrias purificadas foi coletada entre as fases de 21 e 45% de Percoll, suspensa em

40 mL de meio de suspensão, e submetida a duas etapas de centrifugação a 15.000 g, por 15 min cada. Em seguida, o precipitado foi suspenso em três gotas de meio de suspensão e utilizado nos ensaios posteriores. Todas as operações foram realizadas em temperatura entre zero e 4°C.

### **3.5 – Avaliação da Atividade Respiratória em Mitocôndrias Purificadas**

As atividades respiratórias mitocondriais foram determinadas pelo consumo de oxigênio, pela utilização de eletrodo tipo Clark, de fase líquida, acoplado a um registrador polarográfico, segundo método modificado de Hiser & McIntosh (1990). Alíquotas das suspensões de mitocôndrias correspondentes a 0,5 mg de proteína mitocondrial foram adicionadas a 3 mL de meio de reação, composto por sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, BSA 0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, succinato 5 mM, rotenona 5  $\mu\text{M}$  e ATP 100  $\mu\text{M}$ .

Foram efetuadas três adições de ADP 100  $\mu\text{M}$ , a fim de avaliar as variações na velocidade de respiração nos estados 3 e 4, para os cálculos dos coeficientes de controle respiratório e das razões ADP/O.

A atividade da via da oxidase do citocromo c foi avaliada por meio da inibição da respiração, ao nível de complexo III, pela adição de antimicina A 5  $\mu\text{g}$  / mg de proteína mitocondrial.

A atividade da via alternativa foi determinada por meio da inibição da oxidase alternativa, pela adição de ácido salicil-hidroxâmico (SHAM) 1mM.

### **3.6 – Avaliação do Potencial Elétrico Transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) em Mitocôndrias Purificadas**

O potencial elétrico transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio ( $\text{TPP}^+$ ), entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, utilizando-se de um eletrodo específico, montado de acordo com Kamo et al. (1979).

Os testes foram realizados por meio da adição de 0,5 mg de proteína mitocondrial em 1 mL de meio de reação, a 25°C, contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH 7,2), BSA 0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, succinato 5 mM, rotenona 5  $\mu\text{M}$ . Foram realizadas duas adições de ADP (100  $\mu\text{M}$  cada), seguidas de duas aplicações de ácido linoléico (7  $\mu\text{M}$  cada) e uma aplicação de BSA (0,1% p/v).

A atividade da proteína desacopladora (UCP) foi avaliada pela variação do potencial elétrico transmembrana.

### **3.7 – Dosagem de Proteínas**

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos e das suspensões mitocondriais foram determinados espectrofotometricamente conforme Bradford (1976), utilizando curva padrão de BSA.

### **3.8 – Análises Estatísticas**

O efeito dos tratamentos foi avaliado por meio da análise de variância e as médias comparadas pelo teste F ou teste de Duncan, a 5% de probabilidade, ou análise de regressão, conforme o caso. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa de computação GENES (versão 2005.6.1), do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

## **4 – RESULTADOS**

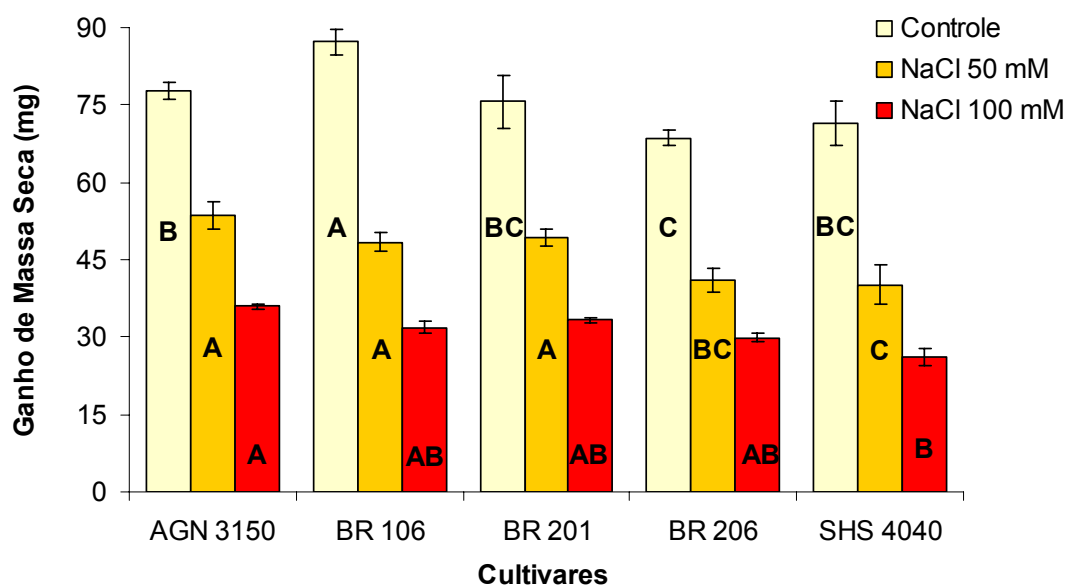
### **4.1 – Seleção de Cultivares de Milho quanto à Tolerância ao Estresse Salino**

#### **4.1.1 – Ganho de Massa Seca**

A exposição ao estresse salino resultou em redução no ganho de massa seca nas partes aéreas de todas as cultivares investigadas (Figura 1 e Quadro 1). Na condição controle, a cultivar BR 106 apresentou os maiores valores de produção de massa seca para a parte aérea. Porém, a análise de regressão indica que esta cultivar apresentou maior grau de redução no ganho de massa seca com o aumento da concentração de NaCl na solução nutritiva. No tratamento com 50 mM de NaCl, os ganhos de biomassa das partes aéreas nas cultivares AGN 3150, BR 106 e BR 201 foram similares e ligeiramente superiores aos das cultivares BR 206 e SHS 4040. No entanto, em termos percentuais, observa-se que as cultivares BR 106 e SHS 4040 apresentaram as maiores reduções (cerca de 45%), enquanto as cultivares AGN 3150 e BR 201 apresentaram apenas 31% e 35% de redução, respectivamente. Padrões similares de resposta, porém mais intensos, foram observados no tratamento com 100 mM de NaCl, no qual as cultivares BR 106 e SHS 4040 apresentaram cerca de 65 % de redução, enquanto as

cultivares AGN 3150, BR 201 e BR 206 apresentaram cerca de 55% de redução no ganho de massa seca de suas partes aéreas.

O ganho de massa seca do sistema radicular também foi afetado pela salinidade, em todas as cultivares analisadas, tendo a cultivar BR 106 apresentado a maior redução no ganho de biomassa deste órgão (Figura 02 e Quadro 02). No tratamento com 50 mM de NaCl, as cultivares AGN 3150 e BR 201 apresentaram cerca de 7% e 10% de redução no ganho de massa seca, respectivamente, enquanto as demais cultivares apresentaram reduções acima de 25%. Na presença de 100 mM de NaCl, a cultivar BR 106 sofreu uma redução de aproximadamente 48%, enquanto a cultivar AGN 3150 apresentou apenas 22% de redução. As demais cultivares apresentaram graus de redução intermediários a estes.

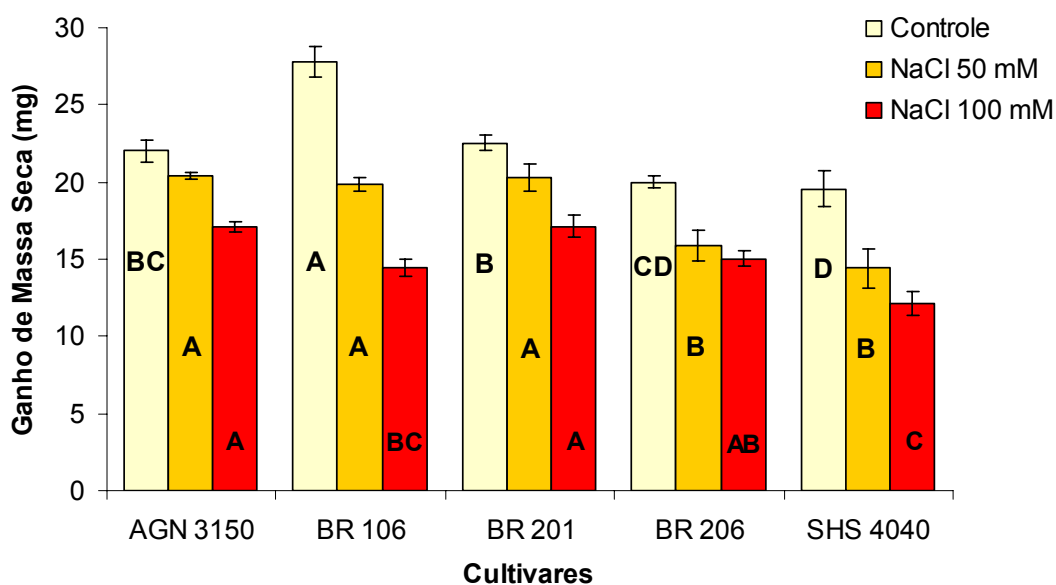


**Figura 1** – Ganho de massa seca da parte aérea de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra, para as diferentes cultivares em um mesmo tratamento, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan (n = 5).

**Quadro 1** – Equações de regressão para o ganho de massa seca da parte aérea de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero, 50 e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento.

Cultivares	Equação*	R <sup>2</sup>
<b>AGN 3150</b>	$y = -0,418x + 76,767$	0,984
<b>BR 106</b>	$y = -0,554x + 83,580$	0,897
<b>BR 201</b>	$y = -0,423x + 73,912$	0,962
<b>BR 206</b>	$y = -0,388x + 65,884$	0,888
<b>SHS 4040</b>	$y = -0,456x + 68,500$	0,910

\* Todos os coeficientes apresentados são estatisticamente significativos a 5% de probabilidade pelo teste *t* bilateral (n = 5).



**Figura 2** – Ganho de massa seca do sistema radicular de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra, para as diferentes cultivares em um mesmo tratamento, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan (n = 5).

**Quadro 2** – Equações de regressão para o ganho de massa seca do sistema radicular de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero, 50 e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento.

Cultivares	Equação*	R <sup>2</sup>
<b>AGN 3150</b>	$y = -0,049x + 22,325$	0,916
<b>BR 106</b>	$y = -0,133x + 27,371$	0,977
<b>BR 201</b>	$y = -0,054x + 22,666$	0,982
<b>BR 206</b>	$y = -0,050x + 19,47$	0,762
<b>SHS 4040</b>	$y = -0,074x + 19,068$	0,908

\* Todos os coeficientes apresentados são estatisticamente significativos a 5% de probabilidade pelo teste *t* bilateral (n = 5).

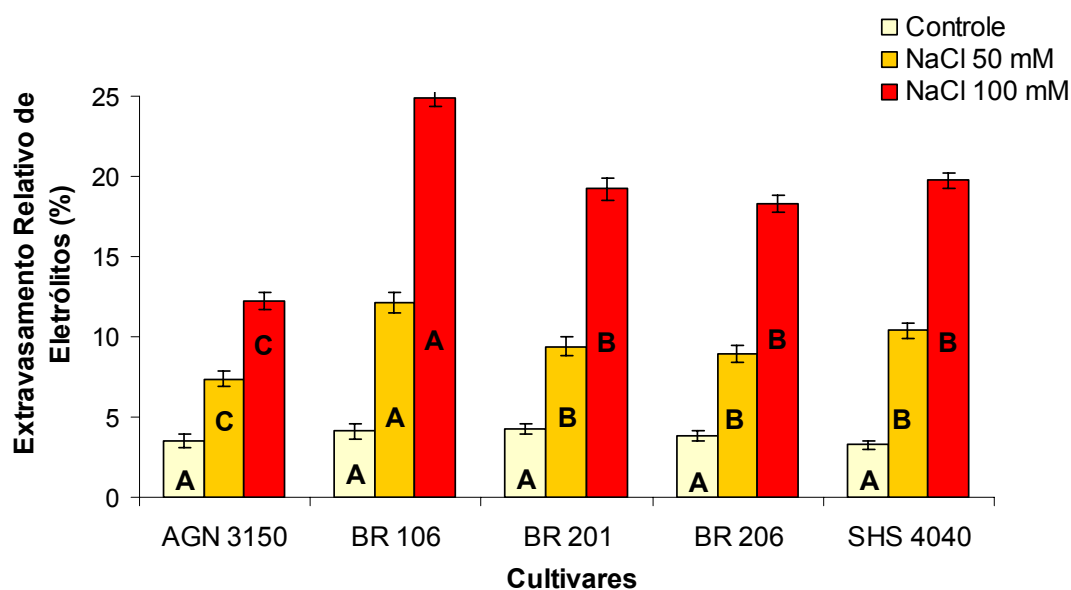
#### **4.1.2 – Extravasamento Relativo de Eletrólitos**

Todas as cultivares estudadas apresentaram porcentagens de extravasamento de eletrólitos semelhantes em suas folhas, quando cultivadas na condição controle (Figura 3). Os tratamentos com NaCl aumentaram o extravasamento de eletrólitos em todas as cultivares analisadas (Quadro 3). Tanto no tratamento com 50 mM como no tratamento com 100 mM de NaCl, a cultivar BR 106 apresentou o maior extravasamento relativo de eletrólitos nas folhas, enquanto a cultivar AGN 3150 apresentou o menor. As demais cultivares apresentaram valores intermediários a estes.

A plantas controle das AGN 3150 e BR 201 apresentaram menores porcentagens de extravasamento de eletrólitos na raízes, enquanto as cultivares BR 106 e SHS 4040 apresentaram as maiores porcentagens (Figura 4). O tratamento com NaCl aumentou o extravasamento em todas as cultivares, sendo que na presença de 50 mM de NaCl os mesmo padrões descritos acima foram observados. Sob tratamento com 100 mM de NaCl, a cultivar AGN 3150 apresentou a menor porcentagem de extravasamento e a cultivar BR 106 apresentou a maior porcentagem, enquanto as demais cultivares apresentaram valores intermediários.

Os valores dos coeficientes angulares obtidos nas análises de regressão corroboram o que foi descrito acima (Quadros 3 e 4). Tanto para a parte aérea quanto para o sistema radicular, a cultivar BR 106 apresentou maior incremento da porcentagem de extravasamento de eletrólitos, enquanto a cultivar AGN 3150 apresentou o menor incremento, como consequência do aumento da salinidade no meio de cultivo.

Com base nestes resultados e naqueles encontrados para a produção de biomassa, foram selecionadas as cultivares AGN 3150 e BR 106, respectivamente, como tolerante e sensível ao estresse salino.

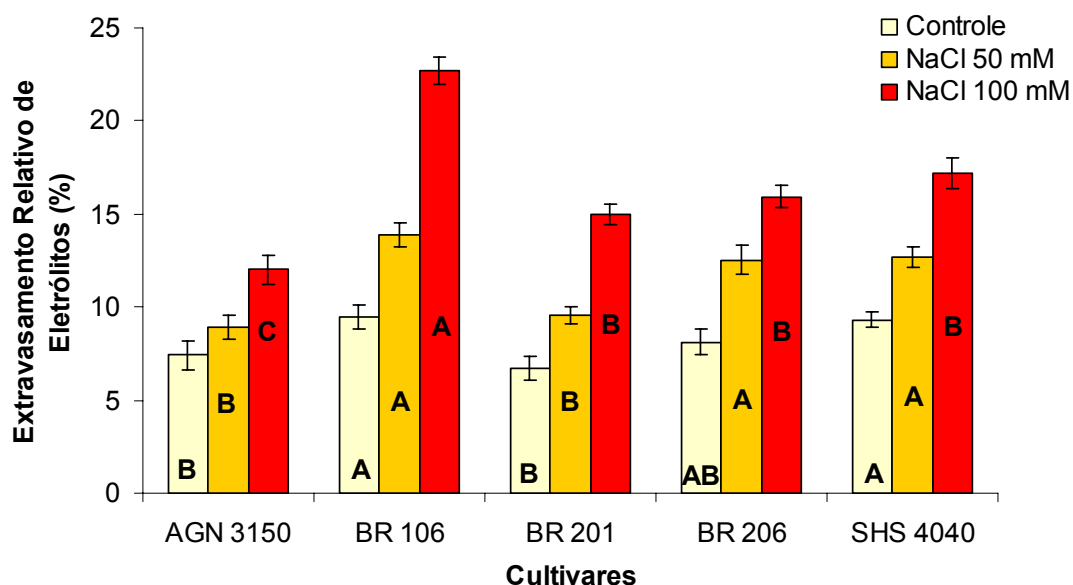


**Figura 3** – Extravasamento relativo de eletrólitos em folhas de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra, para as diferentes cultivares em um mesmo tratamento, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan ( $n = 4$ ).

**Quadro 3** – Equações de regressão para o extravasamento relativo de eletrólitos em folhas de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero, 50 e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento.

Cultivares	Equação*	R <sup>2</sup>
<b>AGN 3150</b>	$y = 0,015x + 2,1226$	0,999
<b>BR 106</b>	$y = 0,028x + 2,2357$	0,993
<b>BR 201</b>	$y = 0,022x + 2,2375$	0,983
<b>BR 206</b>	$y = 0,022x + 2,1504$	0,987
<b>SHS 4040</b>	$y = 0,025x + 2,0816$	0,998

\* Todos os coeficientes apresentados são estatisticamente significativos a 5% de probabilidade pelo teste  $t$  bilateral ( $n = 4$ ).



**Figura 4** – Extravasamento relativo de eletrólitos em raízes de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra, para as diferentes cultivares em um mesmo tratamento, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan (n = 4).

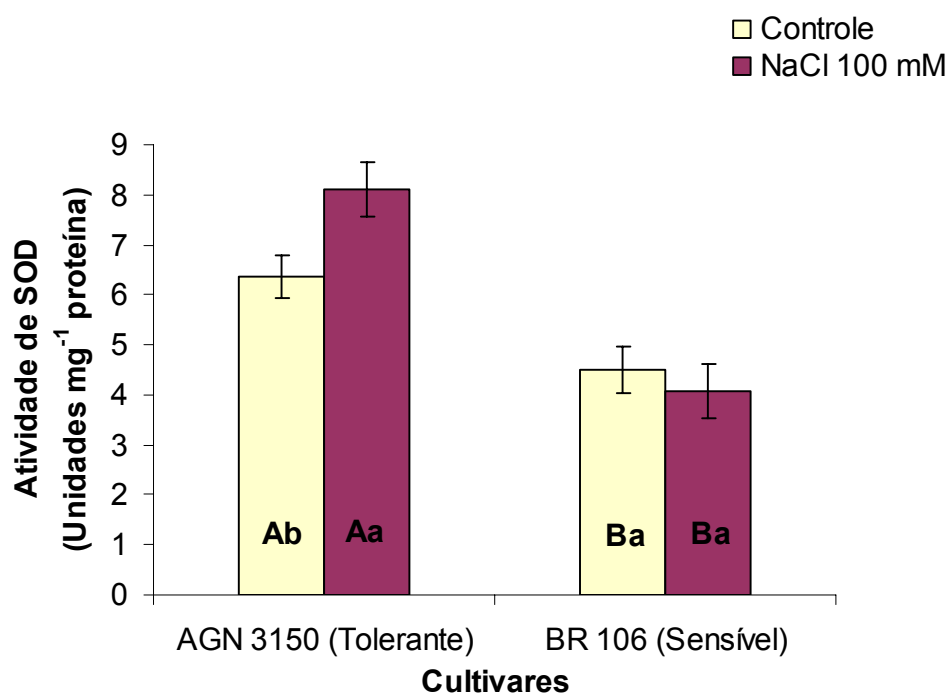
**Quadro 4** – Equações de regressão para o extravasamento relativo de eletrólitos em raízes de plântulas de cinco cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero, 50 e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento.

Cultivares	Equação*	R <sup>2</sup>
<b>AGN 3150</b>	$y = 0,007x + 2,856$	0,949
<b>BR 106</b>	$y = 0,016x + 3,166$	0,965
<b>BR 201</b>	$y = 0,012x + 2,721$	0,971
<b>BR 206</b>	$y = 0,011x + 3,051$	0,973
<b>SHS 4040</b>	$y = 0,011x + 3,195$	0,996

\* Todos os coeficientes apresentados são estatisticamente significativos a 5% de probabilidade pelo teste *t* bilateral (n = 4).

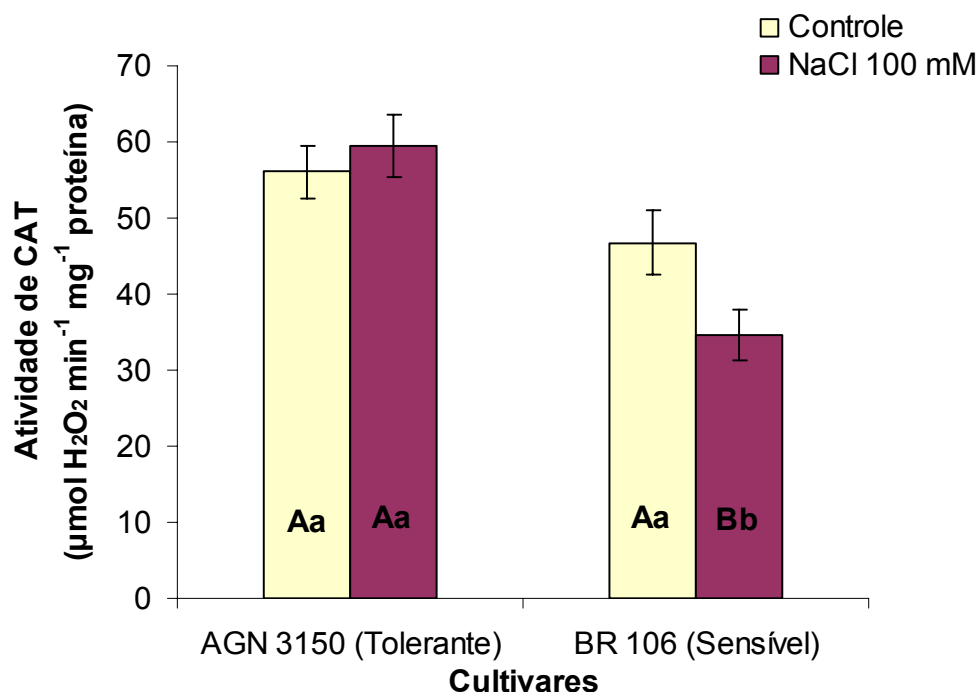
#### 4.2 – Influência do Estresse Salino sobre Enzimas do Sistema Antioxidativo, Teores de Ascorbato e Peroxidação de Lipídeos nos Tecidos Radiculares

A atividade das dismutases do superóxido (SOD) na cultivar BR 106 foi sempre menor que na cultivar AGN 3150, independente da presença de NaCl (Figura 5). Sob estresse salino, a atividade de SOD aumentou em cerca de 28% na cultivar AGN 3150, porém não sofreu alteração significativa na cultivar BR 106. A atividade de SOD que, nas plantas controle, foi 41% mais elevada na cultivar AGN 3150 que na BR 106, sob estresse passou a ser 99% mais elevada.



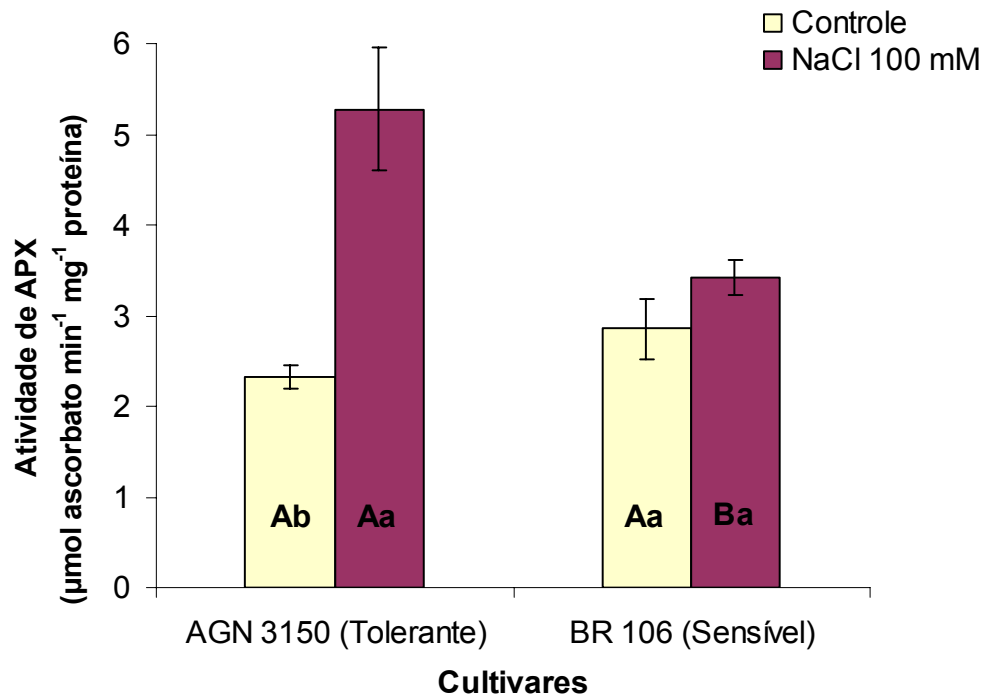
**Figura 5** – Atividade das dismutases do superóxido (SOD) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).

As cultivares analisadas apresentaram atividades de catalases (CAT) similares na condição controle (Figura 6). O tratamento com NaCl não alterou significativamente a atividade de CAT na cultivar AGN 3150, mas reduziu esta atividade em cerca de 26% na cultivar BR 106.



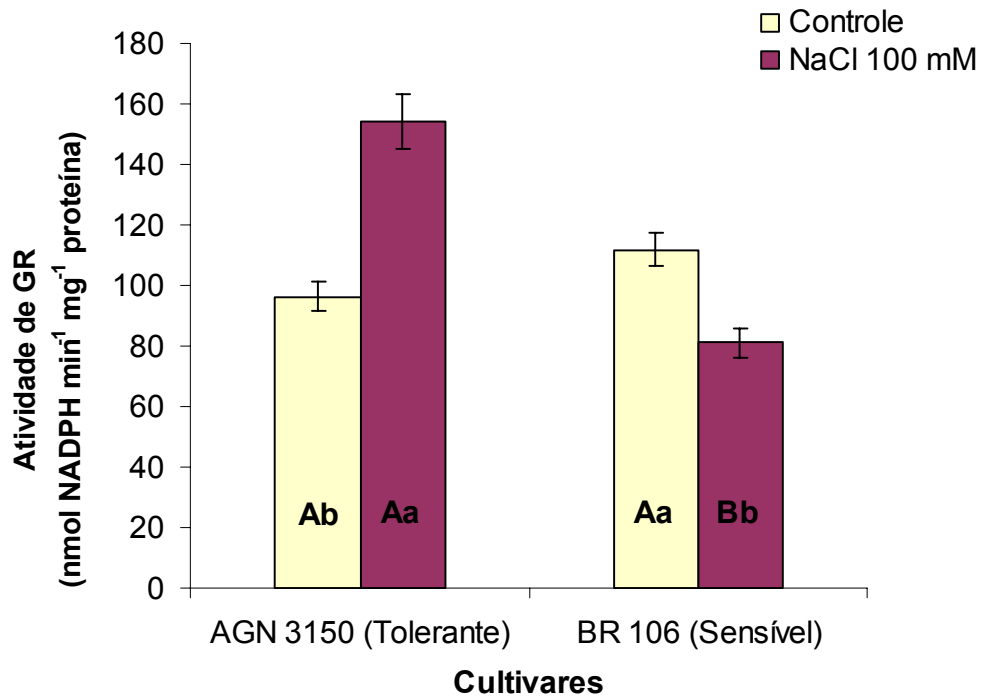
**Figura 6** – Atividade de catalases (CAT) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).

As atividades da peroxidase do ascorbato (APX) nas plantas controle foram semelhantes em ambas as cultivares (Figura 7). A exposição ao estresse salino causou forte aumento na atividade de APX (cerca de 127%) na cultivar AGN 3150, porém não resultou em alteração significativa para a cultivar BR 106.



**Figura 7** – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).

As plantas controle das duas cultivares estudadas apresentaram atividades similares de redutase da glutathiona (GR) (Figura 8). A cultivar AGN 3150, quando exposta ao estresse, apresentou incremento de aproximadamente 60% na atividade de GR, enquanto a cultivar BR 106 sofreu redução de cerca de 27%.



**Figura 8** – Atividade da redutase da glutathiona (GR) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).

As plantas controle das duas cultivares não diferiram entre si quanto aos teores de ascorbato reduzido (Asc), desidroascorbato (DHA), ascorbato total (Asc + DHA) e quanto à razão Asc/DHA (Quadro 5).

A cultivar AGN 3150 não apresentou alterações nos teores de ascorbato total, quando submetida ao estresse por NaCl. No entanto, o teor de desidroascorbato foi reduzido em aproximadamente 30%, o que resultou num aumento considerável da razão Asc/DHA.

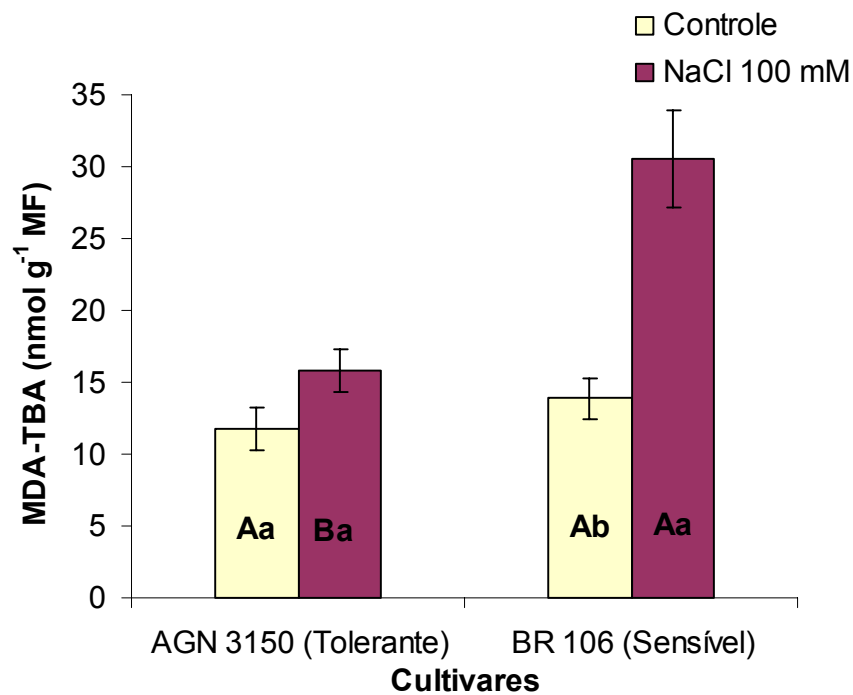
Na cultivar BR 106 observou-se redução dos teores de ascorbato reduzido e total, porém, o teor de desidroascorbato não foi modificado. Conseqüentemente, observou-se um decréscimo na razão Asc/DHA para esta cultivar.

**Quadro 5** – Teores de ascorbato reduzido (Asc), desidroascorbato (DHA), ascorbato total (Asc+DHA) e razão ascorbato reduzido/desidroascorbato (Asc/DHA) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento.

	AGN 3150 (Tolerante)		BR 106 (Sensível)	
	Controle	NaCl 100 mM	Controle	NaCl 100 mM
<b>Ascorbato* (Asc)</b>	0,98 $\pm$ 0,12 Aa	1,20 $\pm$ 0,06 Aa	1,15 $\pm$ 0,08 Aa	0,85 $\pm$ 0,04 Bb
<b>Desidroascorbato* (DHA)</b>	0,37 $\pm$ 0,03 Aa	0,26 $\pm$ 0,02 Bb	0,40 $\pm$ 0,02 Aa	0,44 $\pm$ 0,02 Aa
<b>Ascorbato total* (Asc + DHA)</b>	1,35 $\pm$ 0,11 Aa	1,46 $\pm$ 0,04 Aa	1,55 $\pm$ 0,05 Aa	1,29 $\pm$ 0,05 Ab
<b>Razão Asc/DHA</b>	2,74 $\pm$ 0,49 Ab	4,80 $\pm$ 0,59 Aa	2,94 $\pm$ 0,34 Aa	1,96 $\pm$ 0,15 Bb

\* Dados expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  matéria fresca. Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).

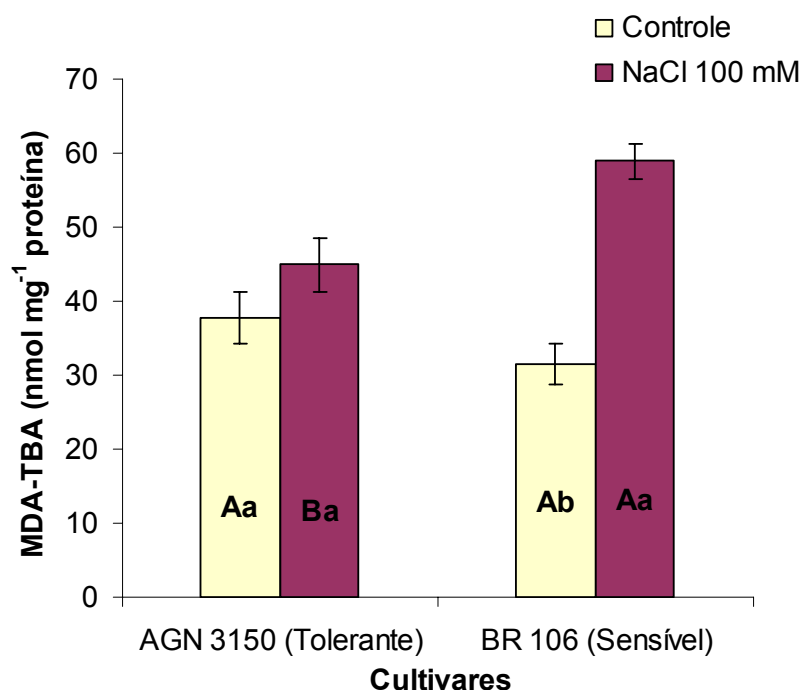
As plantas controle das duas cultivares não diferiram entre si quanto à peroxidação de lipídeos nos tecidos radiculares (Figura 9). A exposição das plantas ao estresse salino, contudo, aumentou significativamente o acúmulo de aldeído malônico (MDA) apenas na cultivar BR 106 (aproximadamente 120%).



**Figura 9** – Peroxidação de lipídeos em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas à concentração de 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).

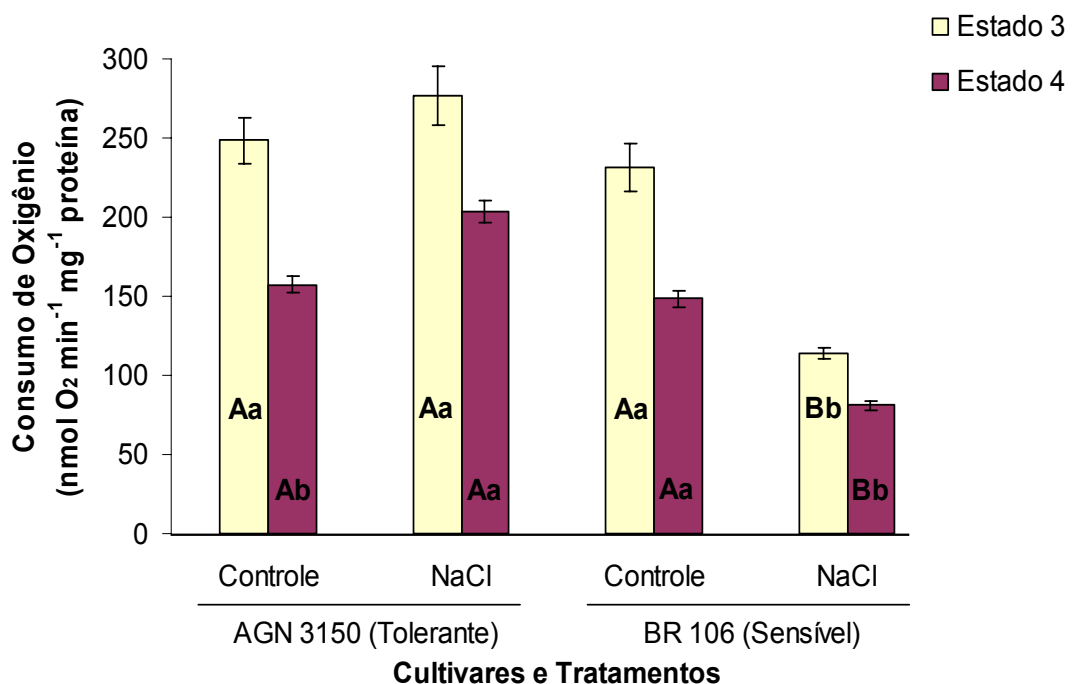
### 4.3 – Efeito do Estresse Salino sobre a Peroxidação de Lipídeos, Atividade Respiratória e Potencial Elétrico Transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) em Mitocôndrias Isoladas de Raízes

O acúmulo de aldeído malônico (MDA) em mitocôndrias isoladas de raízes das plantas controle foi similar nas duas cultivares (Figura 10). O tratamento com NaCl resultou em aumento significativo do teor de MDA apenas para a cultivar BR 106 (aproximadamente 88%).



**Figura 10** – Peroxidação de lipídeos em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho. As plântulas foram submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, durante sete dias. Médias (e erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).

As taxas de consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de raízes de plantas controle foram similares, tanto no estado 3 como no estado 4 (Figura 11). A exposição ao estresse salino não resultou em alteração significativa no consumo de oxigênio no estado 3 para a cultivar AGN 3150, mas causou aumento de aproximadamente 30% deste consumo no estado 4. Diferentemente, para a cultivar BR 106, o tratamento com NaCl acarretou reduções significativas (cerca de 50%) das taxas respiratórias em ambos os estados.



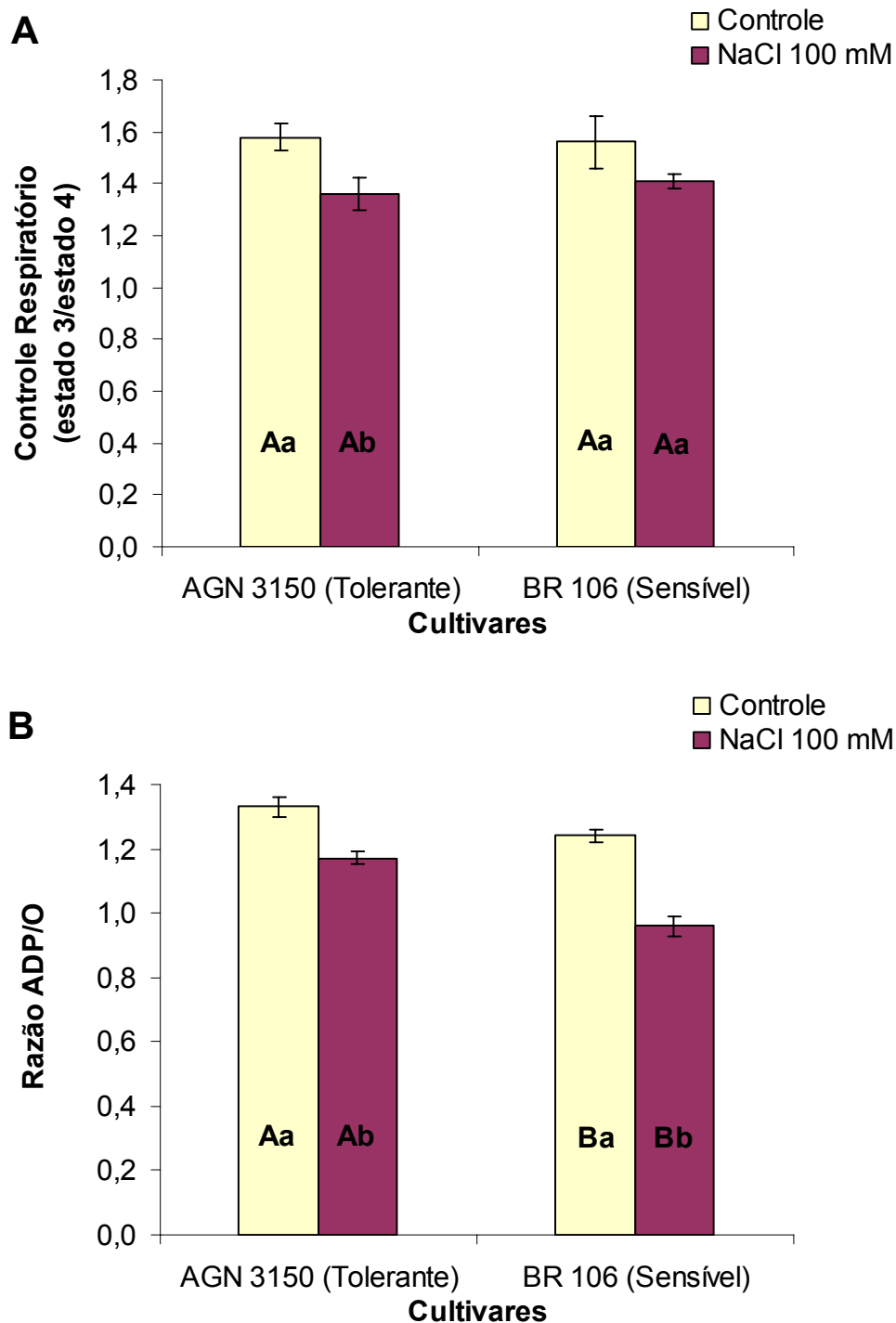
**Figura 11** – Consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).

Os coeficientes de controle respiratório (CR) também apresentaram valores similares para ambas as cultivares na condição controle (Figura 12-A). A presença de NaCl na solução nutritiva ocasionou pequeno decréscimo destes valores para as duas cultivares, porém esta redução foi significativa somente pra a cultivar AGN 3150.

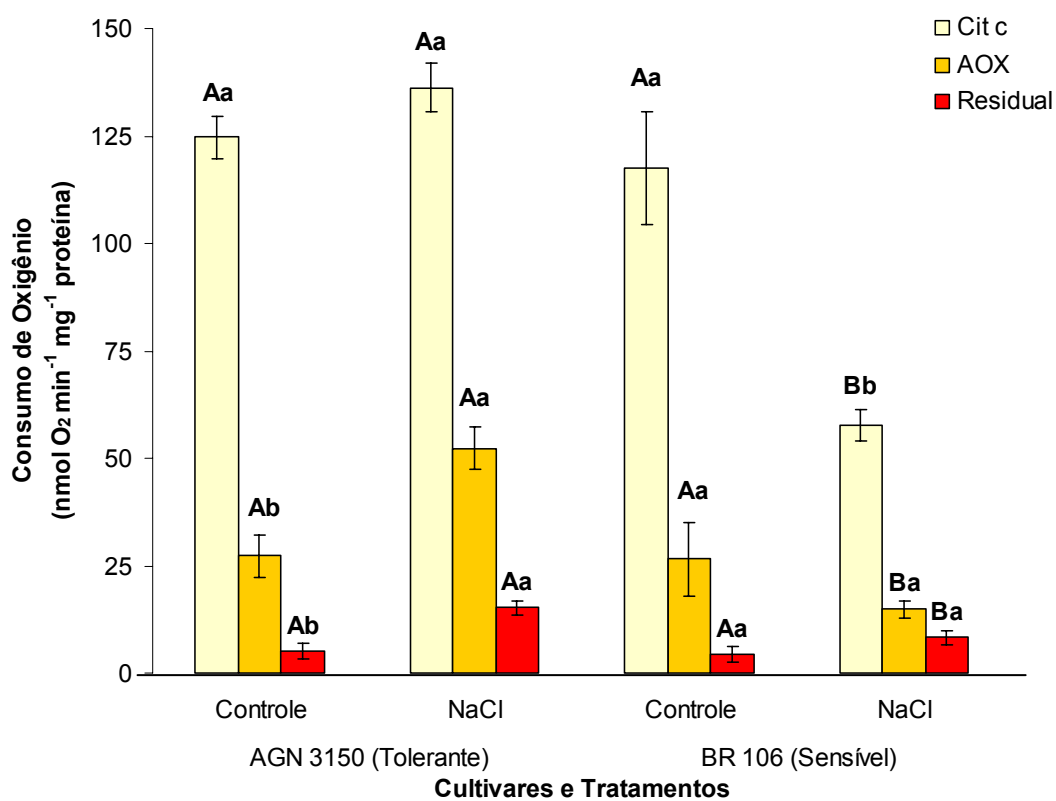
Os valores de razão ADP/O encontrados para as mitocôndrias isoladas da cultivar AGN 3150 foram superiores aos encontrados para a cultivar BR 106, tanto na ausência quanto na presença de estresse salino (Figura 12-B). Ambas as cultivares apresentaram reduções significativas nas razões ADP/O, quando submetidas ao tratamento com NaCl, porém esse decréscimo foi mais expressivo para a cultivar BR 106 (cerca de 23%) do que para a cultivar AGN 3150 (cerca de 12%).

A capacidade de consumo de oxigênio pela via da citocromo *c* oxidase, que foi semelhante para as duas cultivares na condição controle, apresentou forte redução (cerca de 51%) na cultivar BR 106, quando submetida ao estresse salino, porém, permaneceu inalterada na cultivar AGN 3150 (Figura 13). Por outro lado, a capacidade de consumo de oxigênio pela via alternativa apresentou grande incremento (cerca de 92%) na cultivar AGN 3150, em resposta ao NaCl, enquanto na a cultivar BR 106 não houve diferença significativa.

O consumo residual de oxigênio foi semelhante para as duas cultivares na condição controle (Figura 13). O tratamento com NaCl causou aumento do consumo residual de oxigênio apenas para a cultivar AGN 3150. No entanto, na condição controle, as taxas de consumo residual correspondiam a 3% da respiração no estado 4 para ambas as cultivares, mas sob a condição de estresse, estas taxas se elevaram para 7% na cultivar AGN 3150 e para 10% na cultivar BR 106.



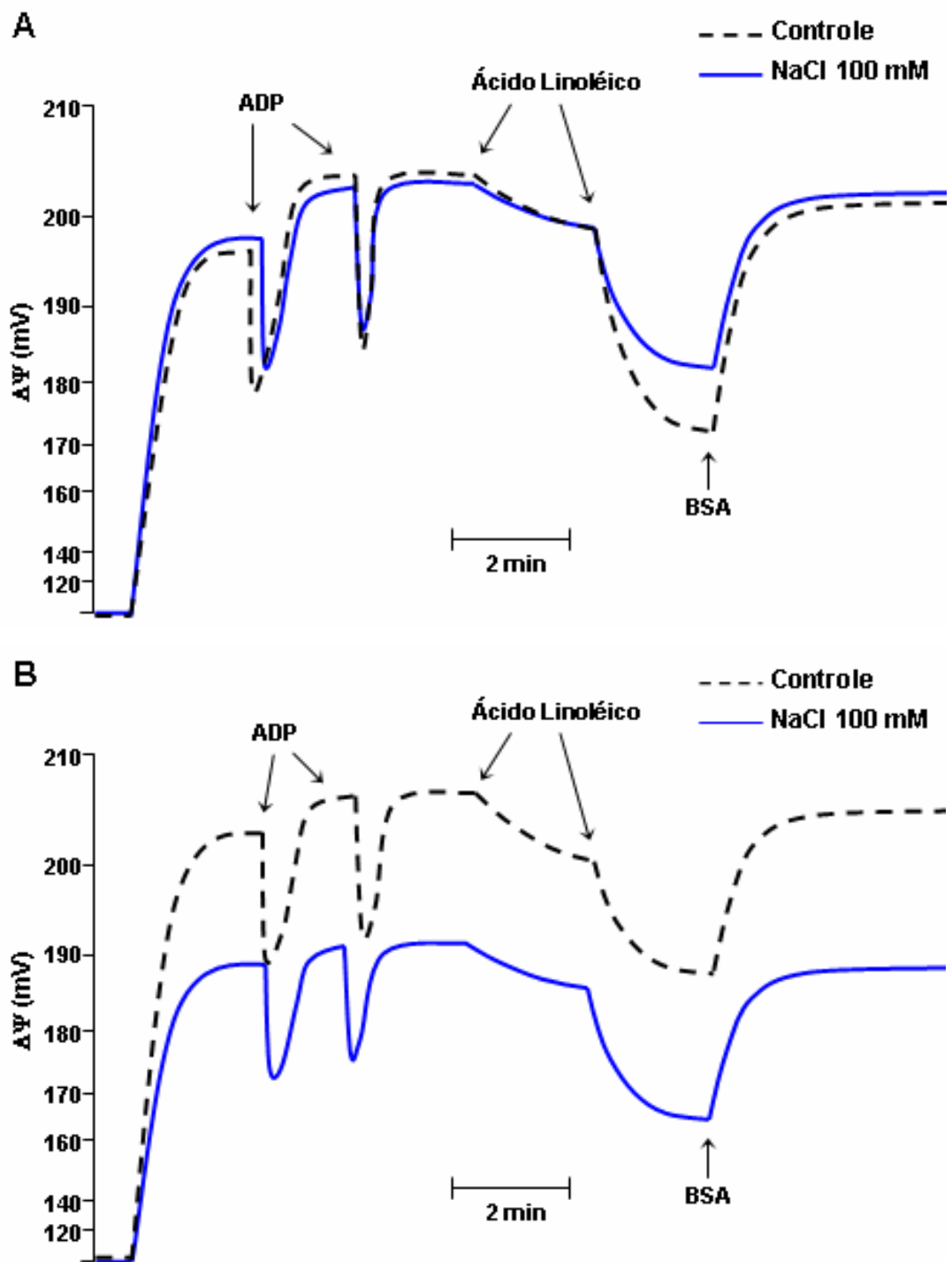
**Figura 12 – (A)** Coeficiente de controle respiratório e **(B)** razão ADP/O em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias ( $\pm$  erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).



**Figura 13** – Consumo de oxigênio pelas vias da oxidase do citocromo *c* (Cit *c*) e da oxidase alternativa (AOX) e consumo residual de oxigênio em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, após sete dias de tratamento. Médias (6 erro padrão) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste F. Letras maiúsculas comparam as cultivares, em um mesmo tratamento, e as minúsculas comparam os tratamentos, na mesma cultivar, (n = 3).

O potencial elétrico transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) no início da avaliação era similar para as mitocôndrias isoladas da cultivar BR 106 (203 mV) e para a cultivar AGN 3150 (197 mV), quando as plantas não foram submetidas ao estresse salino (Figura 14). Após a fosforilação do ADP adicionado, o  $\Delta\Psi$  atingiu valores superiores ao inicial e semelhantes nas duas cultivares. O tratamento das plântulas com NaCl não alterou o  $\Delta\Psi$  inicial nas mitocôndrias da cultivar AGN 3150, porém o reduziu fortemente na cultivar BR 106 (189 mV).

A primeira adição de ácido linoléico resultou em leve decréscimo do  $\Delta\Psi$  em todas as avaliações. Após a segunda adição de ácido linoléico, as mitocôndrias isoladas das plântulas da cultivar AGN 3150, mantidas na condição controle, apresentaram queda de aproximadamente 30 mV no  $\Delta\Psi$ , enquanto as mitocôndrias oriundas de plântulas estressadas apresentaram queda de cerca de 20 mV. O contrário foi observado para a cultivar BR 106, enquanto as mitocôndrias isoladas das plântulas controle apresentaram queda no  $\Delta\Psi$  de 19 mV após a segunda adição de ácido linoléico, as mitocôndrias isoladas das plântulas estressadas apresentaram queda de 26 mV no  $\Delta\Psi$ . Ressalta-se que os valores de  $\Delta\Psi$ , no momento da adição de ácido linoléico, já se apresentavam bastante inferiores nas plântulas da cultivar sensível, tratadas com NaCl.



**Figura 14** – Variação do potencial elétrico transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de milho das cultivares AGN 3150 **(A)** e BR 106 **(B)**. As plântulas foram submetidas às concentrações de zero e 100 mM de NaCl, durante sete dias. Setas indicam as adições de: ADP 0,1 mM; ácido linoléico 7  $\mu$ M; BSA, albumina de soro bovino 0,1% (p/v). Os traçados são representativos de três repetições, obtidas de três preparações mitocondriais diferentes.

## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 – Tolerância à Salinidade em Cultivares Comerciais de Milho

Diversos parâmetros têm sido utilizados como marcadores da tolerância e da sensibilidade ao estresse salino. Dentre estes, os parâmetros de crescimento têm se mostrado os mais efetivos, principalmente o ganho de massa seca (Willadino *et al.*, 1999; Azevedo Neto & Tabosa, 2000; Katerji *et al.*, 2003; Silva *et al.* 2003). Segundo Magalhães (1985), a produção de biomassa seria um dos parâmetros mais significativos para caracterizar a tolerância das plantas, pois é consequência da associação de várias alterações fisiológicas decorrentes da exposição ao estresse.

As cultivares estudadas apresentaram respostas diferenciadas à salinidade, quanto à produção de massa seca (Figuras 1 e 2, Quadros 1 e 2). A cultivar BR 106 apresentou as maiores reduções na produção de biomassa das duas partes da planta. Em contrapartida, a cultivar AGN 3150 apresentou-se como a menos afetada, principalmente para o sistema radicular, onde a porcentagem de redução de matéria seca foi de apenas 22% no tratamento com 100 mM de NaCl. A cultivar BR 106 apresentou uma redução de 28% no crescimento radicular, no tratamento com 50 mM de NaCl, chegando a 48% no nível mais elevado de salinidade. Reduções dessa magnitude são relatadas na literatura, podendo atingir valores maiores com o aumento da concentração de sal ou com o prolongamento do

tratamento (Izzo *et al.*, 1991; Saneoka *et al.*, 1995; Willadino *et al.*, 1999; Azevedo Neto & Tabosa, 2000).

Observa-se, também, que a redução do crescimento na parte aérea foi mais expressiva que no sistema radicular (Figuras 1 e 2). Este padrão é observado na maioria dos resultados de literatura referentes a plantas de milho (Willadino *et al.*, 1999; Azevedo Neto & Tabosa, 2000). Os autores acreditam que isto se deve a um ajustamento osmótico mais rápido e a uma perda de turgor mais lenta das raízes, quando comparadas com a parte aérea. Ademais, o decréscimo do crescimento radicular significa que menor volume de solo estaria disponível para a absorção de água e nutrientes. Desta forma, a manutenção da capacidade de crescimento das raízes pode ser considerada uma característica importante para a tolerância das plantas em condições de alta salinidade.

O extravasamento de eletrólitos pode ser um indicativo da injúria causada à plasmalema em condições de alta salinidade, seja pelo deslocamento do  $\text{Ca}^{2+}$ , devido ao excesso de  $\text{Na}^+$ , ou pelas agressões oxidativas aos lipídeos e proteínas. Assim, o maior extravasamento de eletrólitos apresentado pela cultivar BR 106 sugere que esta cultivar seja mais sensível ao estresse salino, enquanto a cultivar AGN 3150 se apresenta como a mais tolerante.

Em função desses resultados, entre as cultivares estudadas, foram selecionadas a cultivar BR 106, com sendo a mais sensível, e a AGN 3150, como a mais tolerante ao estresse salino.

## **5.2 – Enzimas Antioxidantes, Teores de Ascorbato e Peroxidação de Lipídeos no Sistema Radicular**

De maneira geral, a exposição ao estresse salino resultou em alterações diferenciadas nas atividades das enzimas nas duas cultivares analisadas. O aumento da atividade de SOD apresentado pela cultivar AGN 3150 indica maior capacidade de degradação dos radicais  $\text{O}_2^{\bullet -}$ , na situação de estresse salino, o que deve estar relacionado com sua maior tolerância à

salinidade (Figura 05). O incremento da produção de radicais  $O_2^{\bullet-}$  tem sido amplamente demonstrado como resultado da exposição das plantas a vários tipos de estresses abióticos (Mittler, 2002), inclusive o estresse salino (Hernández *et al.*, 1993).

Aumento da atividade de SOD tem sido demonstrado em cultivares tolerantes à salinidade de várias espécies, tanto em folhas (Gosset *et al.*, 1994; Hernández *et al.* 2000) como em raízes (Shalata *et al.*, 2001). Em milho, entretanto, Azevedo Neto *et al.* (2006) observaram diminuição na atividade de SOD nas raízes de uma cultivar tolerante submetida ao estresse salino, porém, o decréscimo na atividade dessa enzima na cultivar sensível foi mais acentuado. Os dados do presente trabalho permitem inferir que a cultivar tolerante apresenta maior capacidade de remoção dos radicais  $O_2^{\bullet-}$  na condição de estresse, em comparação com a cultivar sensível.

O produto da atividade da SOD é o  $H_2O_2$ , que também é muito tóxico para as células, mas pode ser eliminado por reações espontâneas ou catalisadas por peroxidases e, ou catalases. Eventualmente, os radicais  $O_2^{\bullet-}$  e o  $H_2O_2$  podem ser utilizados como substratos para a reação de Haber-Weiss, produzindo  $OH^{\bullet}$ , considerado o radical mais reativo e danoso para as macromoléculas (Bowler *et al.*, 1992). Portanto, a coordenação adequada das atividades das SOD, CAT e peroxidases é fundamental para manter sob controle a produção do radical  $OH^{\bullet}$ .

Neste contexto, espera-se que o aumento da atividade de SOD seja seguido pelo aumento das atividades das enzimas removedoras de  $H_2O_2$  (Foyer & Noctor, 2005). Embora a atividade de CAT não tenha sido alterada pela salinidade, a atividade de APX foi fortemente aumentada na cultivar tolerante (Figuras 06 e 07). A cultivar sensível, por outro lado, não apresentou alterações significativas na atividade de APX, enquanto a atividade das CAT foi reduzida na presença do estresse. Estes resultados indicam que, além de apresentar melhor proteção contra o  $O_2^{\bullet-}$ , isto é, maior atividade de SOD, a cultivar tolerante apresentou, também, maior capacidade de remoção de  $H_2O_2$ , quando submetida ao estresse salino.

A atividade de APX tem como produtos a água e o monodesidroascorbato (MDHA), o qual sofre dismutação espontânea,

rendendo desidroascorbato (DHA) (Nakano & Asada, 1981). Todavia, o aumento da atividade de APX na cultivar tolerante foi acompanhado por diminuição da concentração desidroascorbato (Quadro 5). Estes resultados, embora pareçam conflitantes, devem-se, provavelmente, ao aumento na atividade de GR, também apresentado por esta cultivar (Figura 8). A atividade desta enzima resulta na produção de glutathiona reduzida (GSH), que pode ser utilizada como doadora de elétrons pela redutase do desidroascorbato (DHAR) para a regeneração do ascorbato a partir do DHA. Da mesma maneira, o decréscimo na atividade de GR na cultivar sensível poderia justificar a diminuição do teor de ascorbato reduzido apresentado por esta cultivar. Cabe ressaltar, porém, que existe a possibilidade de regeneração do ascorbato diretamente a partir do monodesidroascorbato, pela atividade da redutase do monodesidroascorbato (MDHAR), que utiliza NADPH como fornecedor de elétrons. No entanto, como as atividades de DHAR e MDHAR não foram avaliadas neste trabalho, a contribuição relativa do ciclo ascorbato-glutathiona na resposta das cultivares à salinidade não pôde ser completamente esclarecida.

Paralelamente, a glutathiona reduzida (GSH) pode doar elétrons diretamente para intermediários reativos de oxigênio, como o  $\text{OH}^\bullet$ , produzindo  $\text{H}_2\text{O}$  e glutathiona oxidada (GSSG), a qual é convertida a GSH pela atividade de GR, com o consumo de NADPH (Bray *et al.*, 2000). Desta forma, o aumento da atividade de GR na cultivar tolerante e a diminuição na cultivar sensível indicam uma diferença na capacidade de regeneração de GSH entre as mesmas, sugerindo que a cultivar tolerante possua maior eficiência na remoção de intermediários reativos de oxigênio pela via da glutathiona, em comparação com a cultivar sensível. A determinação da concentração de glutathiona, bem como de seu estado redox, forneceria indícios mais relevantes a esta suposição. No entanto, estes parâmetros também não foram determinados no presente trabalho.

A redução do teor de ascorbato total na cultivar BR 106 também pode ser um fator relacionado com sua sensibilidade ao estresse salino (Quadro 5). O ascorbato é um componente não enzimático muito importante para o sistema antioxidativo das plantas, pois pode reagir diretamente com  $\text{O}_2^{\bullet -}$ ,

OH<sup>•</sup> e <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, e também participa da reciclagem do α-tocoferol, dentre outras funções (Smirnoff & Wheeler, 2000). No entanto, alguns autores ressaltam que a integração entre a biossíntese, regeneração e degradação do ascorbato, em resposta a estímulos ambientais é muito complexa (Leonardis *et al.*, 1995; Munné-Bosch & Alegre, 2003; Lorence *et al.*, 2004). Ostergaard *et al.* (1997) demonstraram que a última etapa da biossíntese do ascorbato é catalisada pela enzima desidrogenase da galactono-γ-lactona (GLDH), que oxida a galactono-γ-lactona (GL) utilizando citocromo *c* como aceptor de elétrons. Posteriormente, Bartoli *et al.* (2000) confirmaram a localização da GLDH na membrana mitocondrial interna, e demonstraram que a restrição ao fluxo de elétrons entre os complexos III e IV inibe a síntese de ascorbato, devido ao alto grau de redução do “pool” de citocromo *c*. Portanto, a diminuição do conteúdo de ascorbato apresentado pela cultivar sensível pode estar relacionada com o forte decréscimo da atividade respiratória, induzido pela salinidade nas mitocôndrias isoladas desta cultivar (Figuras 11 e 13). Estes resultados reforçam a opinião de outros autores que sugerem melhor investigação da atividade da GLDH em estudos relacionados ao estresse salino (Mittova *et al.*, 2004a).

A produção de aldeído malônico (MDA), em decorrência da peroxidação de lipídeos, tem sido utilizada como indicativo dos danos oxidativos sofridos pelos tecidos vegetais (Gutteridge & Halliwell, 1990). Assim, como mostrado na literatura (Hernández & Almansa, 2002; Azevedo Neto *et al.*, 2006), o aumento do acúmulo de MDA nas raízes da cultivar sensível (Figura 9) indica menor proteção desta cultivar contra danos oxidativos sob estresse salino. Por outro lado, a manutenção dos níveis baixos de peroxidação de lipídeos, apresentada pela cultivar tolerante (Figura 9), sugere maior eficiência dos seus mecanismos de eliminação de radicais livres. Esses resultados, portanto, corroboram aqueles relacionados às enzimas antioxidativas e ao extravasamento de eletrólitos.

### **5.3 – Atividade Respiratória, Potencial Elétrico Transmembrana ( $\Delta\Psi$ ) e Peroxidação de Lipídeos em Mitocôndrias Isoladas de Raízes**

A capacidade de consumo de oxigênio pela rota alternativa em mitocôndrias isoladas das plantas controle representou 18% da atividade respiratória no estado 4 (Figuras 11 e 13). O tratamento com NaCl elevou a participação percentual da rota alternativa para 26%, apenas na cultivar tolerante, indicando que a atuação da AOX pode explicar o menor acoplamento observado nas mitocôndrias desta cultivar. Jolivet *et al.* (1990) também observaram aumento da atividade da AOX em mitocôndrias isoladas de plantas de cevada tratadas com NaCl e relacionaram esse aumento com a aclimação das plantas ao estresse salino. Segundo Møller (2001), a atuação de elementos dissipadores de energia nas mitocôndrias vegetais é indispensável para a proteção contra a produção de intermediários reativos de oxigênio em condições adversas, bem como para o controle do metabolismo energético da célula. A oxidase alternativa pode desviar os elétrons que fluem na cadeia respiratória e utilizá-los para reduzir o  $O_2$  a  $H_2O$ . Assim, além de diminuir os níveis de ubiquinona reduzida, a AOX também diminui os níveis de  $O_2$ , substrato para a produção de intermediários reativos de oxigênio, na organela (Maxwell *et al.*, 1999; Mittler, 2002). Portanto, os resultados sugerem que o aumento da atividade da AOX na cultivar AGN 3150, induzido pelo estresse salino, pode estar relacionado com a maior tolerância desta cultivar a este estresse.

Em mitocôndrias isoladas de plântulas de milho, Hamilton & Heckathorn (2001) observaram que o NaCl promoveu forte redução na oxidação de succinato pelo complexo II. No presente trabalho, o succinato foi utilizado como substrato respiratório. Portanto, a redução na capacidade de consumo de oxigênio, apresentada pelas mitocôndrias da cultivar BR 106, pode estar relacionada ao efeito tóxico dos íons  $Na^+$  e  $Cl^-$  absorvidos pelas plântulas. Em adição, Pastore *et al.* (2002) relataram que os ânions superóxidos causaram danos ao transporte de succinato através da membrana interna mitocondrial. Como pôde ser observado (Figuras 5 a 9 e Quadro 5), a cultivar BR 106 apresentou menor eficiência na atividade de

remoção de espécies reativas de oxigênio, na condição de estresse. Deste modo, os danos oxidativos, causados pelo estresse salino, também podem estar relacionados com os prejuízos à atividade respiratória apresentados pela cultivar sensível.

A exposição ao estresse salino causou a redução do potencial elétrico transmembrana ( $\Delta\Psi$ ), apenas na cultivar sensível (Figura 14). Esse resultado pode estar relacionado com uma menor ejeção de prótons pela cadeia respiratória, evidenciada pela redução da capacidade de consumo de oxigênio apresentada pelas mitocôndrias isoladas dessa cultivar (Figura 11). Schwarz *et al.* (1991) observaram que mitocôndrias isoladas de células em suspensão de tabaco, adaptadas a meio salino, mantinham a capacidade fosforilativa e o consumo de oxigênio, o que não ocorria nas células não adaptadas.

A redução do  $\Delta\Psi$  em mitocôndrias isoladas da cultivar tolerante, causada pela adição de ácido linoléico, foi mais lenta e menos intensa quando as plântulas foram submetidas ao estresse salino (Figura 14). Esse resultado indica que a atividade da proteína desacopladora (CPU) foi reduzida pelo estresse salino, nesta cultivar. Contrariamente, a maior redução do  $\Delta\Psi$ , na presença de ácido linoléico, na cultivar sensível sugere aumento na atividade da UCP, quando exposta ao estresse salino. Em mitocôndrias isoladas de plântulas de trigo, Trono *et al.* (2004) observaram o aumento da atividade da UCP em plântulas tratadas com NaCl. Estes autores sugerem que o aumento da atividade da UCP pode estar relacionado com a tolerância ao estresse, pois esse aumento também foi capaz de reduzir a produção de radicais superóxidos. Da mesma forma, outros estudos têm sugerido que a participação da UCP é importante para a defesa celular contra o estresse oxidativo (Pastore *et al.*, 2000; Brandalise *et al.*, 2003), o que torna os resultados observados contrários às expectativas relacionadas à atuação da UCP sob condições de estresse salino.

Adicionalmente, Smith *et al.* (2004) propuseram um modelo para a participação da UCP na modulação do balanço energético nas mitocôndrias. Neste modelo, o 4-hidroxi-2-*trans*-nonenal, produto resultante da peroxidação de lipídeos desencadeada por intermediários reativos de

oxigênio, é a molécula ativadora da condutância a prótons promovida pela UCP. Segundo esses autores, um  $\Delta\Psi$  elevado leva ao aumento na produção de ROIs e, conseqüentemente, à produção de 4-hidroxi-2-*trans*-nonenal e à ativação da UCP. Desta forma, a elevada condutância a prótons reduz o  $\Delta\Psi$ , diminuindo a produção de ROIs e aliviando a restrição termodinâmica sobre o fluxo do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. No presente trabalho, observou-se o aumento da peroxidação de lipídeos apenas nas mitocôndrias da cultivar sensível (Figura 10), o que pode explicar o aumento da atividade da UCP nessa cultivar. Todavia, a atividade da UCP aparentemente não contribui para a tolerância à salinidade na cultivar tolerante.

## **6 – CONCLUSÕES**

As plântulas das cultivares AGN 3150 e BR 106 apresentaram sensibilidade diferenciada ao estresse salino. A cultivar AGN 3150 foi mais tolerante, enquanto a cultivar BR 106 foi mais sensível ao estresse salino.

O aumento da razão ascorbato/desidroascorbato e das atividades das enzimas dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato e redutase da glutathiona indicam que a maior eficiência da cultivar AGN 3150 na remoção de intermediários reativos de oxigênio pode ser parte do seu mecanismo de tolerância ao estresse salino.

A manutenção da atividade da cadeia respiratória e o menor grau de acoplamento promovido pela oxidase alternativa, nas mitocôndrias da cultivar AGN 3150, também podem contribuir para a maior tolerância desta cultivar ao estresse salino.

Os dados obtidos, referentes à proteína desacopladora, não permitem relacionar a sua atividade com a maior tolerância da cultivar AGN 3150 ao estresse salino.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERICO, G.J. & CRAMER, G.R. Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? I. Preliminary screening of seven cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, 16, 2289-2303 p. 1993.
- ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L. & CRAMER, C. L. Reactive Oxygen species and antioxidants – Relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**. 100, 224-233 p. 1997.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K. & STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**. 109 (4), 1247-1257 p. 1995.
- APSE, M. P.; AHARON, G. S.; SNEDDEN, W. A. & BLUMWALD, E. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport in *Arabidopsis*. **Science**. 285, 1256-1258 p. 1999.
- ARAKAWA N.; TSUTSUMI K.; SANCEDA N.G.; KURATA T. & INAGAKI C. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural Biology Chemistry**. 45, 1289-1290 p. 1981.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase: A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**. 85, 235-241 p. 1992.

- 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**, 16 (1), 31-38p. 2004.
- AZEVEDO NETO, A. D. & TABOSA, J. N. Estresse salino em plântulas de milho: Parte II distribuição dos macronutrientes catiônicos e suas relações com sódio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 4 (2), 165-171p. 2000.
- AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C. E. B. de & GOMES-FILHO, E. Effect of stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**. 56, 87-94 p. 2006.
- BARTOLI, C. G.; PASTORI, G. M. & FOYER, C. H. Ascorbate Biosynthesis in Mitochondria Is Linked to the Electron Transport Chain between Complexes III and IV. **Plant Physiology**. 123, 335–343 p. 2000.
- BEERS Jr., R. F. & SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**. 195, 133–140 p. 1952.
- BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44, 276-287 p. 1971.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M. Van & INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 43, 83-116 p. 1992.
- BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, 218, 443-448 p. 1982.
- 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**. 72, 248-254 p. 1976.

- BRANDALISE, M.; MAIA, I. G.; BORECKÝ, J.; VERCESI, A. E. & ARRUDA, P. Overexpression of Plant Uncoupling Mitochondrial Protein in Transgenic Tobacco Increases Tolerance to Oxidative Stress. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 35 (3), 203-209 p. 2003.
- 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. 1158-1203 p.
- CARLBERG, I. & MANNERVIK, B. Glutathione Reductase. **Methods in Enzymology**.113, 484-495 p. 1985.
- CRAMER, G. R.; LÄUCHLI, A. & POLITO, V.S. Displacement of Ca<sup>2+</sup> by Na<sup>+</sup> from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? **Plant Physiology**, 79, 207-211 p. 1985.
- DAY, D. A. & HANSON, J. B. On methods for the isolation of mitochondria from etiolated corn shoots. **Plant Science Letters**. 11, 99-104 p. 1977.
- DAY, D. A. & WISKICH, J. T. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. **Journal of Bioenergetics and Biomembrane**. 27, 379-385 p. 1995.
- FAO, 2000. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils, disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm> (acessado em 12 de Janeiro de 2006).
- FOYER, C. H. & HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**. 133, 21-25 p. 1976.
- FOYER, C. H. & NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signaling. **New Phytologists**, 146, 359-388 p. 2000.
- FOYER, C. H. & NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**.119, 355-364 P. 2003.

- FOYER, C. H. & NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, 28, 1056–1071 p. 2005.
- GIANNOPOLITIS, C. N. & RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**. 59, 309–314 p. 1977.
- 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**. 34, 706–714 p. 1994.
- GREENWAY, H. & MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, 31, 149-190 p. 1980.
- GUTTERIDGE, J. M. C. & HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Science**. 15, 129-135 p. 1990.
- HAMILTON, E. W. & HECKATHORN, S. A. Mitochondrial Adaptations to NaCl. Complex I is Protected by Anti-oxidants and Small Heat Shock Proteins, Whereas Complex II is protected by Proline and Betaine. **Plant Physiology**, 126, 1266-1274 p. 2001.
- 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**. 51, 463-499 p. 2000.
- HAVIR, E.A. & McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84, 450-455 p. 1987.
- HEATH, R. L. & PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysic**. 125, 189–198 p. 1968.
- HERNÁNDEZ, J. A. & ALMANSA, M. S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiologia Plantarum**. 115, 251–257 p. 2002.

- HERNÁNDEZ, J. A.; CORPAS, F. J.; GÓMES, M.; RIO, L. A. del & SEVILLA, F. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. **Physiologia Plantarum**, 89, 103-110 p. 1993.
- HERNÁNDEZ, J. A.; JIMÉNEZ, A.; MULLINEAUX, P. & SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. **Plant Cell Environment**. 23, 853–862 p. 2000.
- HISER, C. & McINTOSH, L. Alternative oxidase of potato is an integral membrane protein synthesized *de novo* during aging of tuber slices. **Plant Physiology**, 93, 312-318 p. 1990.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**. 347, 1-32 p. 1950.
- IZZO, R.; NAVARI-IZZO, F. & QUARTACCI, F. Growth and mineral absorption in maize seedlings as affected by increasing NaCl concentrations. **Journal of Plant Nutrition**, 14, 687-699 p. 1991.
- JACKSON, C.; DENCH, J. E.; HALL, D. O. & MOORE, A. L. Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica soil gradient centrifugation. **Plant Physiology**. 64, 150-153 p. 1979.
- JIMENEZ, A.; HERNÁNDEZ, J. A.; RIO, L. A. del & SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**. 114, 275-284 p. 1997.
- JOLIVET, Y.; PIREAUX, J. C. & DIZENGREMEL, P. Changes in Properties of Barley Leaf Mitochondria Isolated from NaCl-Treated Plants. **Plant Physiology**. 94, 641-646 p. 1990.
- KAFI, M.; STEWART, W. S. & BORLAND, A. M. Carbohydrate and Proline Contents in Leaves, Roots, and Apices of Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Wheat Cultivars. **Russian Journal of Plant Physiology**, 50 (2), 155–162 p. 2003.

- KAMO, N.; MURATSUGU, N.; HONGO, R. & KOBATAKE, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical and phosphorylation potential in steady state. **Journal of Membrane Biology**. 49, 105-121 p. 1979.
- KATERJI, N.; HOORN, J.W. van; HAMDY, A.; MASTRORILLI, M. Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. **Agricultural Water Management**, 62, 37–66 p. 2003.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**. 34, 713-721p. 1993.
- LEONARDIS, S. de; LORENZO G. de; BORRACCINO, G. & DIPIERRO S. A Specific Ascorbate Free Radical Reductase Isozyme Participates in the Regeneration of Ascorbate for Scavenging Toxic Oxygen Species in Potato Tuber Mitochondria. **Plant Physiology**. 109, 847-851 p. 1995.
- LORENCE, A.; CHEVONE, B. I.; MENDES, P. & NESSLER, C. L. *myo*-Inositol Oxygenase Offers a Possible Entry Point into Plant Ascorbate Biosynthesis. **Plant Physiology**. 134, 1200–1205 p. 2004.
- MAGALHÃES, A. C. N. Análise quantitativa do crescimento. *in*: FERRI, M. G. (Coord.). **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1985. v.1, 333-350 p.
- MAXWELL, D. P.; WANG, Y. & McINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**. 96, 8271-8276 p. 1999.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, 7(9), 405-409 p. 2002.
- MITTOVA, V.; GUY, M.; TAL, M.; & VOLOKITA, M. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Journal of Experimental Botany**, 55 (399), 1105-1113 p. 2004a.

- MITTOVA, V.; THEODOULOU, F. L.; KIDDLE, G.; VOLOKITA, M.; TAL, M.; FOYER, C. H. & GUY, M. Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, *L. pennellii* – a role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. **Plant, Cell and Environment**, 27, 237–250 p. 2004b.
- MØLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 52, 561-591 p. 2001.
- MUNNÉ-BOSCH, S. & ALEGRE, L. Drought-Induced Changes in the Redox State of  $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbate, and the Diterpene Carnosic Acid in Chloroplasts of Labiatae Species Differing in Carnosic Acid Contents. **Plant Physiology**. 131, 1816–1825 p. 2003.
- NAKANO, Y. & ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**. 22, 867–880 p. 1981.
- NOCTOR, G. & FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 49, 249–279 p. 1998.
- OSTERGAARD, J.; PERSIAU, G.; DAVEY, M. W.; BAUW, G. & VAN MONTAGU, M. Isolation of a cDNA coding for L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. **Journal of Biological Chemistry**. 272, 30009–30016 p. 1997.
- PASTORE, D.; FRATIANNI, A.; Di PEDE, S. & PASSARELLA, S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. **FEBS Letters**. 470, 88–92 p. 2000.
- PASTORE, D.; LAUS, M. N.; Di FONZO, N. & PASSARELLA, S. Reactive oxygen species inhibit the succinate oxidation-supported generation of membrane potential in wheat mitochondria. **FEBS Letters**. 516, 15–19 p. 2002.

- RASMUSSEN, A. G.; HEISER, V.; ZABALETA, E.; BRENNICKE, A. & GROHMANN, L. Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1364, 1401-1411 p. 1998.
- RESENDE, M.; CURI, N.; REZENDE, S. B. & CORRÊA, G. F. **Pedologia: base para distinção de ambientes**. Viçosa: NEPUT, 1995. 304 p.
- RICHARDSON, S. G. & McCREE, K. J. Carbon balance and water relations of sorghum exposed to salt and water stress. **Plant Physiology**, 79, 1015-1020 p. 1985.
- 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**, 107, 631-638 p. 1995.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, 103, 7-12 p. 1993.
- SCANDALIOS, J. G.; TONG, W. F. & ROUPAKIAS, D. G.). *Cat3*, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: Genetics, intracellular location, and some biochemical properties. **Molecular & General Genetics**.179, 33-41 p. 1980.
- SCHWARZ, M.; LERNER, H. R. & REINHOLD, L. Mitochondria Isolated from NaCl-Adapted Tobacco Cell Lines (*Nicotiana tabacum/gossii*) Maintain Their Phosphorylative Capacity in Highly Saline Media. **Plant Physiology**. 96, 69-76 p. 1991.
- SERRAJ, R. & SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant Cell Environmental**. 25, 333-341 p. 2002.
- 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 CaCl<sub>2</sub>. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 15(2), 99-105 p. 2003.

- 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**. 112, 487–494 p. 2001.
- SMIRNOFF, N. & WHEELER, G. L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. **Critical Review in Plant Science**. 19, 267–290 p. 2000.
- SMITH, A. M. O.; RATCLIFFE, R. G. & SWEETLOVE, L. J. Activation and Function of Mitochondrial Uncoupling Protein in Plants. **The Journal of Biological Chemistry**. 279 (50), 51944–51952 p. 2004.
- TRONO, D.; FLAGELLA, Z.; LAUS, M. N.; DI FONZO N. & PASTORE, D. The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hyperosmotic stress in mitochondria from durum wheat seedlings. **Plant, Cell and Environment**. 27, 437–448 p. 2004.
- VAN HOORN, J. W. Development of soil salinity during germination and early seedling growth and its effect on several crops. **Agricultural Water Management**. 20, 17-28 p. 1991.
- VANLERBERGHE, G. C. & McINTOSH, L. C. Alternative oxidase: From gene to function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 48, 703-734 p. 1997.
- VERCESI, A. E.; MARTINS, I. S.; SILVA, M. A. P.; LEITE, H. M. F.; CUCCOVIA, I. M. & CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**, 375, 24 p. 1995.
- WILLADINO, L.; MARTINS, M. H. B.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G. & ALVES, G. D. Resposta de genótipos de milho ao estresse salino em condições hidropônicas. **Scientia Agricola**, 56 (4), 1209-1213 p. 1999.
- WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; MONTAGU, M. Van; INZÉ, D. & CAMP, W. Van. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C<sub>3</sub> plants. **The EMBO Journal**, 16(16), 4806-4816 p. 1997.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S. & ZHU, J. K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **The Plant Cell**, 165 – 183 p. 2002.

ZÖRB C.; NOLL, A.; KARL, S.; LEIB, K.; YAN, F. & SCHUBERT, S. Molecular characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, 162, 55-66 p. 2005.