ÓXIDO NÍTRICO MODULA OS SISTEMAS PRIMÁRIOS DE TRANSPORTE DE PRÓTONS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE O ESTRESSE SALINO EM PLANTAS MUTANTES E NÃO MUTANTES EM ÁCIDO ABSCÍSICO

MIRELLA PUPO SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –UENF

> CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ AGOSTO – 2009

O ÓXIDO NÍTRICO MODULA OS SISTEMAS PRIMÁRIOS DE TRANSPORTE DE PRÓTONS E AS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE O ESTRESSE SALINO EM PLANTAS MUTANTES E NÃO MUTANTES EM ÁCIDO ABSCÍSICO

MIRELLA PUPO SANTOS

"Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas."

Orientador: Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith Co-orientador: Prof. Arnoldo Rocha Façanha

> CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ AGOSTO-2009

O ÓXIDO NÍTRICO MODULA OS SISTEMAS PRIMÁRIOS DE TRANSPORTE DE PRÓTONS E AS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE O ESTRESSE SALINO EM PLANTAS MUTANTES E NÃO MUTANTES EM ÁCIDO ABSCÍSICO

MIRELLA PUPO SANTOS

"Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas."

Aprovada em 7 de agosto de 2009.

Comissão Examinadora:

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

Prof. Lázaro (D.Sc., Ciências Biológicas) - ESALQ

Prof. Arnoldo Rocha Façanha (D.Sc., Química Biológica) – UENF (Co-orientador) À Deus;

Aos meus pais Paulo e Virgína;

Ao meu irmão Fhilipe;

À minha Vó Laura

DEDICO

"Viver e não ter a vergonha de ser feliz.. cantar e cantar e cantar ... a alegria de ser um eterno aprendiz....."

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo E. Bressan-Smith pela orientação, pela amizade, apoio e profissionalismo;

Ao Prof. Dr.Arnoldo Rocha Façanha pela co-orientação, pela oportunidade, experiência científica, amizade e, acima de tudo, por acreditar na minha capacidade;

Ao meu amigo e companheiro de trabalho Daniel Zandonadi pela amizade e apoio estando ao meu lado em todos os momentos, auxiliando na elaboração das hipóteses, dos experimentos e das discussões da tese;

À Profa. Dra Marla Binzel pelo fornecimento das sementes de tomateiro mutantes em ácido abscisico;

Ao Prof. Dr. Alexandre Pio Viana pelo fornecimento das sementes de milho UENF- 512 e pela participação na banca de defesa de tese;

Ao Prof. Dr Lázaro E. P. Peres pela participação na banca de tese e sua enorme experiência profissional auxiliando de forma significativa;

Ao prof. Gonçalo Apolinário pela participação na banca de projeto e pelo apoio;

Ao Prof. Dr. Messias G. Pereira pelo fornecimento das sementes de milho UENF- 512;

Aos colegas, Silvia, Inga, Guilherme, Leonardo, Renata, Juliana, Leandro, Viviane, Lilian, Liane, Sarah, Clara, Gleidson e Luciane, pela amizade e

colaboração. Aos funcionários da UENF, em especial, ao secretário Daniel, pelo coleguismo e competência, auxiliando muito os alunos;

Aos professores do curso de genética e melhoramento de plantas, pelos conhecimentos transmitidos;

Aos colegas do curso, pelo companheirismo;

Aos meus pais, Paulo e Virginia, meu irmão, Fhilipe, e à minha vovó, Laura, e a toda família, pelo amor incondicional, carinho e apoio constante, me ajudando a suportar as dificuldades, a distância e a saudade;

À minha querida amiga Juliana Motta Oliveira que mesmo de longe está sempre presente em minha vida. Obrigada pelo amor, carinho e amizade;

À minha querida amiga Eliomara S. S. Alves pela amizade, apoio e seus valiosos conselhos;

A Universidade Federal Norte Fluminense pela oportunidade de realização do curso e pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que, de uma forma ou outra, participaram de mais esta conquista.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Salinidade	4
2.1.1 Alterações no metabolismo das plantas pela salinidade	6
2.1.2 Mecanismos de tolerância ao estresse salino	8
2.1.2.1 Manutenção da homeostase celular	8
2.1.2.2 Ajustamento osmótico	11
2.1.2.3 Redução do estresse oxidativo	13
2.1.2.4 Balanço entre a absorção e dissipação de luz:	
Fluorescência da clorofila a	14
2.2 Sinalização: ABA, Óxido Nítrico	16
2.2.1 Ácido Abscísico	16
2.2.2 Mutantes Hormonais	18
2.2.2.1 Tomateiro mutante (sitiens)	18
2.2.3 Óxido Nítrico	19
3-TRABALHOS	22
A modulação de bombas de prótons e de enzimas antioxidantes em	
resposta ao estresse salino é mediada por óxido	24
nítrico	27

Resumo	25
Abstract	25
Introdução	26
Material e Métodos	28
Resultados	33
Discussão	36
Conclusão	44
Referências Bibliográficas	44
Produção de óxido nítrico e interação com ácido abscísico na	
modulação de bombas de prótons e na indução de enzimas	
antioxidantes durante o estresse salino	64
Resumo	64
Abstract	65
Introdução	66
Material e Métodos	68
Resultados	80
Discussão	86
Conclusão	95
Referências Bibliográficas	96
4-RESUMO E CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

RESUMO

SANTOS, Mirella Pupo; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Agosto, 2009. O óxido nítrico modula os sistemas primários de transporte de prótons e as enzimas antioxidantes durante o estresse salino em plantas mutantes e não mutantes em ácido abscísico. Professor orientador: Ricardo Enrique Bressan-Smith. Professor Co-Orientador: Arnoldo Rocha Façanha. Conselheiros: Alexandre Pio Viana e Gonçalo Apolinário de Souza Filho.

O fitohormônio ácido abscísico (ABA) está relacionado à regulação de respostas adaptativas a estresses ambientais. O óxido nítrico (ON) é relatado como mediador de respostas hormonais, em particular mediando efeitos de hormônios e moléculas envolvidas em estresses abióticos. No primeiro trabalho da presente tese, objetivou-se verificar a participação do ON em vias de indução de respostas ao estresse salino em plantas de milho. Foi possível verificar a atenuação dos efeitos da salinidade em raiz e parte aérea pelo tratamento com o doador de ON (SNP). O tratamento com SNP incrementou a atividade de enzimas antioxidantes possibilitando a redução da peroxidação lipídica em raízes. Observou-se aumento da produção de ON durante o estresse salino, sendo esta produção atribuída principalmente a redutase do nitrato (RN) e possivelmente a enzima associada a produção de ON (NOA1). O tratamento com o doador de ON incrementou a atividade de P-ATPase, V-ATPase e PPase comprovando a hipótese da participação desta molécula na modulação de bombas de prótons. No segundo trabalho, se buscou entender a interação entre o hormônio ABA e o ON em processos fisiológicos durante o estresse salino. Para tal, foi utilizado um tomateiro mutante sitiens deficiente na produção de ABA. As plantas mutantes apresentaram grande susceptibilidade ao estresse salino, sendo este fator explicado por características inerentes a este genótipo e possivelmente causada pela redução da produção de ON nas raízes durante o estresse. A redução da produção de ON nas raízes foi atribuída, em grande parte, à enzima RN, pelo fato da atividade desta ser reduzida de forma considerável durante o estresse salino nas plantas *sitiens*. Observou-se que o ABA é necessário na indução de enzimas antioxidantes em plantas controle durante o estresse salino. Na via de sinalização induzida pelo ABA possivelmente o ON atue como sinalizador após este hormônio. ON minimizou os efeitos danosos provocados pelo tratamento salino reduzindo a peroxidação lipídica e mantendo a integridade de membranas, sendo estes fatores atribuídos ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes e das bombas de prótons. O balanço da ativação entre as bombas de H⁺ associado à síntese de ON pode compor um dos mecanismos de controle de resposta ao estresse salino.

ABSTRACT

SANTOS, Mirella Pupo; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; August, 2009. Nitric oxide regulates primary proton transport systems and antioxidants enzymes during salt stress in abscisic acid-mutant and non-mutant plants. Adviser: Ricardo Enrique Bressa-Smith. Professor Co-adviser: Arnoldo Rocha Façanha. Committe Members: Alexandre Pio Viana and Gonçalo Apolinário de Souza Filho.

The phytohormone abscisic acid (ABA) is related to the regulation of adaptive responses to environmental stresses. Nitric oxide (NO) is reported as a mediator of hormonal responses particularly mediating effects of hormones and molecules involved in abiotic stresses. In the first work of this Thesis, the aim was to understand the role of NO in the induction of responses to salt stress in maize plants. It was shown that the NO donor (SNP) reduced the salinity effects in root and shoot. The SNP increased the activity of antioxidant enzymes leading to a reduction of lipid peroxidation in roots. It was observed an increase in the NO production during salt stress in maize roots, which was attributed to the nitrate reductase (RN) and possibly to the NO associate enzyme 1 (NOA1). The treatment with SNP enhanced the activity of P-ATPase, V-ATPase and PPase confirming the hypothesis of NO role in the proton pumps modulation. The second work aimed to understand the interaction between the hormone ABA and NO in physiological processes during salt stress. Therefore, the mutant tomato sitiens deficient in ABA production was used. The mutants showed a high susceptibility to salt stress and this feature was explained by the inherent characteristics of this genotype and possibly by the reduced production of NO in the roots during stress. The reduced production of NO in roots was attributed in part to the enzyme NR, which showed reduced activity during salt stress in sitiens plants. It was shown that ABA is required to antioxidant enzymes' activation in wild type plants during salt stress, and NO possibly act as a signal downstream ABA pathway. NO alleviated the salt stress effects, reducing lipid peroxidation and maintaining the cell membranes integrity, characteristic possible related to both antioxidant and proton pumps activation. The concerted regulation in pre- and post transcriptional levels of H⁺ pumps associated with NO synthesis and the induction of antioxidant enzymes may integrate a mechanism of plant responses to salt stress.

1. INTRODUÇÃO

Os estresses abióticos são um dos fatores limitantes à produtividade. A salinização do solo provoca alterações no metabolismo da planta, geradas por estresse osmótico e iônico. Como conseqüência, há alterações na fotossíntese, intensificação de processos oxidativos e inibição de diversas enzimas essenciais ao metabolismo da planta resultando na redução da produtividade (Zhao et al., 2007; Ghanem, et al., 2008; Debouba et al., 2007).

Durante o estresse salino a entrada de CO₂ fica limitada havendo a redução na disponibilidade de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada (NADP⁺) (Lawlor, 2002). Nestas condições, o oxigênio compete com o NADP⁺ como redutor podendo gerar o superóxido,O₂⁻, uma espécie reativa de oxigênio (EROs). As EROs são responsáveis pela degradação de pigmentos fotossintéticos, inativação de enzimas e peroxidação lipídica, resultando em injúrias nas membranas celulares (Bartels e Sunkar, 2005; Smirnoff, 1993).

O estresse oxidativo e iônico gerado durante a salinização é amenizado pela atuação de enzimas antioxidantes, que degradam as EROs, e por transportadores secundários como, Na⁺/H, que promovem a exclusão e ou alocação de íons no vacúolo. A ativação dos transpotadores secundários é dependente da atuação de transportadores primários de prótons, como a P-ATPases e a H⁺-PPase, responsáveis pelo equilíbrio osmótico e iônico celular. A modulação de enzimas antioxidantes e de bombas de prótons, entre outros

processos tem sido relacionada à aquisição de tolerância a salinidade (Bartels e Sunkar., 2005; Chaves et al., 2008).

As plantas sob estresse salino apresentam acúmulo de ácido abscísico (ABA), fitormônio importante para regulação de respostas adaptativas ao estresse. O aumento da sua produção está correlacionado, ao fechamento estomático, acúmulo de osmorreguladores, indução da atividade de enzimas antioxidantes e aumento da expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse (Bartels e Sunkar., 2005; Chaves et al., 2008).

A participação de ABA durante o estresse abiótico tem sido relacionada à atuação de outra molécula, o óxido nítrico (ON). O ON é um gás lipofílico que se difunde facilmente no meio intracelular e é atualmente apontado como grande sinalizador de processos fisiológicos, atuando na modulação de sinais gerados por hormônios, afetando os níveis de mensageiros secundários. Esta molécula esta relacionada à indução da atividade de MAPK na via de indução de raízes laterais por auxina (Pagnussat et al., 2004) e na participação da indução ao fechamento estomático induzido por ABA, por sua atuação na indução de canais de Ca⁺² e mobilização intracelular de Ca⁺² e canais de K⁺ e Cl⁻ (Sokolovski et al., 2005; Sokolovski e Blatt, 2004; Garcia-Mata et al., 2003). Outros estudos trazem ainda a participação do ON como mediador na via de indução de enzimas antioxidantes promovida pelo ABA (Zhang et al., 2006) e na indução de estresses abióticos (Zhang et al., 2007; Song et al., 2006).

Existem poucos trabalhos estudando a interação entre ABA e o óxido nítrico em vias de sinalização durante o estresse, tornando-se necessários mais estudos para desvendar o papel do óxido nítrico em algumas vias de sinalização mediada por ABA. Neste trabalho foi utilizada como ferramenta uma planta mutante na produção de ABA em tomateiro para entender a participação do óxido nítrico na via de sinalização promovida por ABA, ou seja, se esta molécula está antes (*upstream*) ou após (*downstream*) o ABA, ou mesmo se participa de outra rota independente de ABA na mediação de respostas ao estresse salino.

Primeiramente, procurou-se afirmar o papel do ON como modulador da bioenergética celular durante o estresse salino e logo após foi realizado o estudo da interação desta molécula com o ABA, procurando determinar a sua participação em vias dependentes e não dependentes de ABA, para então

estabelecer qual interação existe entre o ON e este fitormônio durante o estresse salino.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Salinidade

A salinidade e a sodicidade dos solos ocorrem em diversas regiões do mundo, sendo um problema ainda mais grave em regiões áridas e semi-áridas. Os solos salinos são aqueles com elevada quantidade de sais solúveis incluindo sulfatos (SO_4^{-2}) , carbonatos (CO_3^{-2}) e cloretos (CI^{-1}) . Os solos sódicos possuem conteúdo elevado de Na⁺ a ponto de restringir o crescimento vegetal (Bartels e Sunkar, 2005).

O departamento de agricultura americano classifica os solos como salinos quando a condutividade elétrica é igual ou maior do que 4 dS/m (USDA, 2008), o que equivale aproximadamente a 40 mM de NaCl e pode gerar uma pressão osmótica de cerca de 0,2 MPa (USDA, 2008).

A salinidade é um problema encontrado em 30 % dos solos irrigados no mundo. A expansão da agricultura em áreas áridas e semi-áridas e o uso da irrigação de forma incorreta contribuem para aumentar este problema por ser a água o agente transportador de sais (Silveira et al., 2001; Chaves et al., 2008).

As plantas submetidas à salinização do solo modificam seu metabolismo de tal forma que há redução do crescimento, desenvolvimento e produtividade (Cruz et al., 2003; Willadino e Camara, 2005; Bartels e Sunkar, 2005; Wang et al., 2008).

A concentração elevada de sais pode afetar as plantas de duas formas principais: (1) provocando o estresse osmótico, afetando imediatamente o crescimento, sendo causado pelo sal presente no ambiente externo às raízes e; (2) induzindo o estresse iônico, o qual se desenvolve mais lentamente e é resultado da combinação do acúmulo de íons nos ramos da planta e da sua inabilidade de tolerar esses íons acumulados (Munns e Tester, 2008).

Para lidar com os estresses ambientais os vegetais desenvolveram diversas estratégias, como mecanismos de adaptação e hábitos de crescimentos específicos, tornando-as mais tolerantes ao estresse. A percepção rápida do estresse garante respostas apropriadas alterando o metabolismo, crescimento e desenvolvimento. As respostas ao estresse envolvem sensores de estresse, vias de sinalização que compreendem uma rede de proteínas que interagem entre si, fatores de transcrição, genes e finalmente metabólitos e proteínas relacionadas ao aumento da tolerância ao estresse (Chaves et al., 2009; Bartels e Sunkar, 2005).

Plantas tolerantes a estresse desenvolveram mecanismos adaptativos apresentando diferentes graus de tolerância os quais são determinados fortemente pela variabilidade genética. É relatado que o programa genético para tolerância esteja presente pelo menos em algum grau em plantas não tolerantes. A adaptação gradual da planta ao estresse envolve a expressão apropriada de genes responsáveis pela tolerância, levando a aquisição de tolerância a plantas antes consideradas não tolerantes (Chaves et al., 2009; Bartels e Sunkar, 2005). Desta forma os diferentes tipos de tolerância podem ser atribuídos a diferenças na percepção ao estresse, na transdução de sinal e na apropriada modificação na expressão gênica e do metabolismo (Chaves et al., 2009).

A adaptação à salinidade é sem dúvida um dos processos mais complexos e que envolvem numerosas alterações no metabolismo e desenvolvimento das plantas incluindo aumento transitório do fitormônio ácido abscísico (ABA), acúmulo de solutos compatíveis e proteínas protetoras, indução da atividade e expressão de enzimas antioxidantes, modulação de transportadores primários e secundários e supressão das vias consumidoras de energia (Munns et al., 2006; Chaves et al., 2008). Como o estresse salino ocorre freqüentemente e pode afetar a maioria dos ambientes, compreender a tolerância à salinidade é fundamental, sendo este um dos tópicos de pesquisa mais importantes.

2.1.1 Alterações no metabolismo das plantas pela salinidade

A salinidade altera a fotossíntese devido à redução da assimilação de CO₂, mudanças da osmolaridade celular e do equlibrio iônico. O excesso de sais diminui o potencial osmótico do solo, reduzindo a disponibilidade de água para as plantas, acarretando no fechamento dos estômatos para minimizar a perda de água pela transpiração. A redução da entrada de CO₂ pelo fechamento estomático limita as reações de carboxilação, reduzindo desta forma a atividade fotossintética (Reddy et al., 1992; Lawlor e Cornic, 2002). A redução da difusão de CO₂ ocorre ainda no mesófilo gerado por mudanças físicas e estruturais e alterações bioquímicas geradas pelo estresse (Lawlor e Cornic, 2002; Flexas et al., 2004; Flexas et al., 2007). Além do estresse osmótico, o excesso de íons modifica a dinâmica celular inativando diversas proteínas e moléculas como transportadores de elétrons da fotossíntese (Munns et al., 2006; Chaves et al., 2008; Reddy et al., 1992; Lawlor e Cornic, 2002). Enzimas que necessitam do K⁺ como co-fator são particularmente sensíveis à alta concentração de Na⁺ ou ao aumento da taxa Na⁺/K⁺. Concentrações de Na⁺ acima de 100 mM inibem diversas enzimas, principalmente as relacionadas à fotossíntese (Lawlor e Cornic, 2002; Chaves et al., 2008).

A redução de CO_2 limita a disponibilidade de nicotinamida adenina nucleotídeo oxidada (NADP⁺), que constitui um aceptor de elétrons no fotossistema I (Lawlor e Cornic, 2002). Nestas condições, o oxigênio compete com o NADP⁺ como redutor podendo gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) como o superóxido (O_2^-) (Newton e McBeath, 1996; Reddy et al., 2004; Sudhir e Murthy, 2004; Naumann et al., 2007; Chaves et al., 2008). As EROs causam entre outros problemas a inativação de enzimas, degradação de pigmentos fotossintéticos e peroxidação lipídica de membranas celulares (Smirnoff, 1993; Bartels e Sunkar, 2005; Sekmen et al., 2007).

As membranas celulares são basicamente compostas por proteínas e lipídios. Os lipídios são compostos ricos em pontes de hidrogênio e alvos de

reações oxidativas A peroxidação lipídica causa danos nas membranas celulares, reduzindo a integridade destas estruturas. As reações oxidativas são problemáticas também para enzimas, podendo levar a modificações em suas estruturas, bem como para os ácidos nucléicos como o DNA (Smirnoff, 1993).

Os pigmentos fotossintéticos também são afetados pelas altas concentrações de sal. Os conteúdos de clorofila e carotenóides diminuem em plantas consideradas sensíveis a este estresse como, milho, tomate, batata e feijão. Já em plantas tolerantes há a manutenção da concentração de clorofilas e aumento da concentração de carotenóides (Hernandez et al., 1995; Gadallah, 1999). Plantas sob estresse prolongado desenvolvem clorose e há perda de folhas (Hernandez et al., 1995; Gadallah, 1999, Agastian et al., 2000).

A salinidade afeta o estado nutricional vegetal por alterar o equilíbrio iônico celular provocando a inibição da absorção de outros íons. O aumento no nível de Na⁺ e Cl⁻ freqüentemente resulta em redução na concentração de K⁺, Ca²⁺, PO₄⁻, e NO₃⁻ (Cramer et al., 1991; Martinez e Lauchli, 1994; Gouia et al., 1994). O íon nitrato (NO₃⁻) é a principal forma nitrogenada absorvida pelas plantas, sendo, posteriormente, reduzido a amônio (NH4⁴⁺) por reações de redução, na qual, a redutase do nitrato (RN) é considerada enzima chave no processo, catalisando o primeiro passo na via (Debouba et al., 2007, Gouia et al., 1994). O estresse salino afeta diretamente o metabolismo do nitrogênio, devido às mudanças iônicas e osmóticas geradas, alterando a atividade da RN e de enzimas relacionadas, como a nitrito redutase e NADH-GOGAT (Gouia et al., 1994; Abd-ElBaki et al., 2000; Flores et al., 2000; Carillo et al., 2005; Silveira et al., 2001; Debouba et al., 2007).

As organelas celulares são alteradas em resposta ao estresse gerado pelo excesso de sal. Há desenvolvimento de vacúolos, modificações no retículo endoplasmático, diminuição das cristas mitocondriais, fragmentação do tonoplasto e degradação do citoplasma (Mitsuya et al., 2000). Plantas tratadas com NaCl apresentaram alterações das estruturas dos tilacoídes dos cloroplastos tornado-os desorganizados (Hernandez et al., 1995). O estresse osmótico gerado leva ainda a redução do tamanho celular e aumento da densidade de células, ou seja, números de células por milímetro quadrado. Estes resultados foram encontrados em tecidos como parênquima paliçádico e esponjoso (Hernandez et al., 1995; Mitsuya et al., 2000).

Como resultado de tantas alterações no metabolismo e fisiologia resultantes da salinidade ocorre a inibição de diversas características de desenvolvimento tais como: a expansão da superfície foliar, a biomassa de folhas e raízes (Hernandez et al., 1995; Bartels e Sunkar, 2005), a altura da planta, o número de folhas por planta, o comprimento de raízes e a superfície de raízes por planta e conseqüentemente a redução da produtividade (Mohammad et al., 1998; Bartels e Sunkar, 2005).

2.1.2 Mecanismos de tolerância ao estresse salino

As plantas podem ser classificadas como halófitas ou glicófitas de acordo com a tolerância ao estresse salino. As halófitas são plantas que toleraram quantidades elevadas de sais (500 mM de NaCl) na rizosfera sem afetar seu crescimento (Flowers et al., 1977; Niu et al., 1993). Já plantas que não conseguem desenvolver-se sobre o substrato com elevado conteúdo de sais solúveis são conhecidas como glicófitas. A vantagem das halófitas sobre as glicófitas advém da melhor atuação de mecanismos de tolerância, que proporcionam um manejo mais eficiente em acumular e compartimentar os solutos (Flowers et al., 1977) ou excluí-los (Niu et al., 1993).

As plantas possuem mecanismos bioquímicos e moleculares para tolerar o estresse salino através de produtos e processos alternativos. Entre estes mecanismos estão: (1) a exclusão seletiva de íons e/ou compartimentalização de íons em nível celular (vacúolos) e estrutural (folhas); (2) síntese e acúmulo de osmólitos; (3) alterações na fotossíntese e na fluorescência da clorofila a; (4) indução de enzimas antioxidantes e (5) síntese de hormônios e moléculas associadas à sinalização durante o estresse (Hasegawa et al., 2000).

2.1.2.1 Manutenção da homeostase celular

As bombas de prótons de membrana plasmática e vacuolar exercem um papel fundamental no controle do pH citoplasmático e na manutenção da homeostase celular, bem como na expansão celular (Taiz e Zeiger, 1998; Gaxiola et al., 2007; Gaxiola et al., 2001).

A homeostase celular é importante para a atividade de várias enzimas e para a manutenção de um potencial de membrana e osmótico adequado para a regulação do volume celular (Serrano et al., 1999). A regulação do fluxo iônico é necessária para a manutenção de níveis baixos de íons tóxicos e para o acúmulo dos íons essenciais ao desenvolvimento celular (Serrano e Rodriguez-Navarro, 2001; Zhu, 2003). O íon Na⁺ é considerado potencialmente tóxico para as plantas, havendo a necessidade de limitar sua entrada e/ou compartimentalizar este em tecidos mais velhos, formando um ambiente estoque, que posteriormente será eliminado por meio da absicisão de folhas velhas (Taiz e Zeiger 1998; Hasegawa et al., 2000).

Em condições normais as plantas mantêm concentrações de K⁺ maiores do que de Na⁺ no citosol através de transportadores antiportes K⁺/H⁺ e Na⁺/H⁺ condicionados a gradientes eletroquímicos dependentes de ATP (Serrano,1999; Zhu et al., 2003; Hassidim, 1990). O K⁺ é elevado em condições normais, pois é um íon móvel, que possui função osmótica, regulando a abertura e fechamento dos estômatos, auxiliando na ascensão capilar do NO₃ ⁻no xilema e atuando na ativação enzimática (Taiz e Zeiger, 1998).

Os sistemas de transporte primários de prótons da membrana plasmática e vacuolar são considerados importantes marcadores moleculares em estudos sobre mudanças da membrana associadas a vários estresses ambientais (Matsumoto et al., 1992; Gaxiola et al., 2002).

O H⁺-ATPase constitui o principal sistema de transporte primário da membrana plasmática (H⁺-ATPase do tipo P), sendo responsável pela energização dos sistemas secundários de transporte. No tonoplasto, encontramse duas diferentes bombas de prótons, uma H⁺-ATPase (tipo V) e uma H⁺pirofosfatase (H⁺-PPase) (Rea et al., 1992). Estas bombas são capazes de gerar um gradiente eletroquímico de prótons no tonoplasto acidificando o vacúolo e fornecendo energia para o transporte de íons inorgânicos, açúcares e ácidos orgânicos (Rea e Sanders, 1987). Esse gradiente de H⁺ gerado através da membrana vacuolar pode também impulsionar a síntese de ATP e PPi, devido à capacidade de reversibilidade dos ciclos catalíticos dessas enzimas (Façanha e de Meis, 1998).

A exclusão de sal para o apoplasto e o acúmulo de sal no vacúolo das plantas requer uma ação coordenada das proteínas de transporte presentes na

membrana plasmática e no tonoplasto (Binzel e Ratajczak, 2002). Os transportadores secundários, como Na⁺/H⁺, são dependentes da energização das membranas promovida por transportadores primários de H⁺ (ATPases e PPases). Esse transporte pode servir como fonte de energia para a retirada do Na⁺ do citoplasma via antiporte (Serrano e Rodriguez-Navarro, 2001).

Alguns trabalhos relataram o papel de algumas destas bombas durante o estresse salino. Binzel e Dunlap (1995) demonstrou que o nível de RNA mensageiro que codifica as H⁺-ATPases das membranas plasmática e vacuolar é aumentado em resposta ao estresse salino em tomateiro. Estas enzimas foram moduladas de forma diferenciada, onde no mesmo tecido, no mesmo tempo, os transcritos para a H⁺-ATPase de membrana continuavam a aumentar enquanto que para a V-ATPase começava-se a retornar para os níveis anteriores à aplicação do sal.

A halófita *Mesembryanthemum. crystallinum* crescida sob elevadas concentrações de NaCl apresentou atividade do antiporte Na⁺/H⁺ associada ao transporte de H⁺ dependente da atividade de hidrólise de ATP promovida pela V-ATPase em folhas (Barkla et al., 1995). Durante o estresse salino, osmótico, de frio e de calor, 12 subunidades da V-ATPase tiveram o nível de seus transcritos alterados em folhas e raízes de *M. crystallinum* (Kluge et al., 2003). A V-ATPase possui uma estrutura complexa formada por várias subunidades reguladas por diferentes genes (Sze et al., 1992; Ratajczack, 2000).

O estímulo da atividade hidrolítica e do transporte de H⁺ tanto da H⁺-ATPase de membrana quanto da de vacúolo por Na⁺ são observados em caule de algumas plantas halófitas (Ayala et al., 1996). Tsiantis et al. (1996) demonstraram que a subunidade *c* da V-ATPase em raízes e folhas de *M. crystallinum* tem sua expressão aumentada na presença de sal e ABA. Segundo esses autores, o aumento da atividade da V-ATPase observada no trabalho de Barkla et al. (1995) poderia ser explicado pela regulação da expressão da subunidade c dessa enzima. Enquanto há o aumento do nível de transcritos da subunidade c da V-ATPase mediado por ABA em *M. crystallinum*, Binzel e Dunlap (1995) observaram que o aumento da subunidade *a* durante o estresse salino não parece ser mediado por ABA em tomateiro.

A H⁺-PPase também tem um papel importante durante o estresse salino. Gaxiola et al., (2001) relataram que a super-expressão do gene AVP1 que codifica a H⁺-PPase resultou em tolerância ao estresse salino e hídrico em plantas de Arabidopsis. A resistência foi atribuída à retenção de íons, que manteve o equlibrio iônico celular. O gene AVP1 também tem sido relacionado com o desenvolvimento radicular e organogênese, associado à facilitação do fluxo de auxina e regulação da H⁺-ATPase de membrana (Li et al., 2005). Em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) a expressão aumentada de AVP1 gerou aumento da resistência à seca, elevando o crescimento radicular, a absorção de água, o potencial hídrico foliar e a sobrevivência das plantas (Park et al., 2005). A expressão em paralelo do gene AVP1 e do antiporte vacuolar Na⁺/H⁺ (SsNHX1) em arroz revelou uma tolerância à salinidade de maneira mais pronunciada do que a expressão do antiporte isoladamente (Zhao et al., 2006).

2.1.2.2 Ajustamento osmótico

Em condições normais a célula acumula compostos de baixo peso molecular, os osmólitos, que não interferem nas reações bioquímicas habituais das plantas, para adequar o balanço iônico nos vacúolos (Chaves e Oliveira, 2004). Em condições de estresse, estas substâncias mantêm o balanço osmótico sustentando a integridade de diversos elementos como membranas celulares e enzimas (Chaves e Oliveira, 2004). Compostos nitrogenados, polióis e açúcares são alguns exemplos de osmólitos (Chaves e Oliveira, 2004; Bartels e Sunkar, 2005).

No ajuste osmótico, os osmólitos facilitam a retenção de água no citoplasma e permitem o seqüestro de Na⁺ para o vacúolo (Bartels e Sunkar; Apse et al, 2000). Por serem aptos em formar pontes de hidrogênio, estes compostos protegem as estruturas celulares através da sua interação com membranas, complexos protéicos ou enzimas evitando os danos gerados pelo estresse iônico e osmótico (Chaves e Oliveira, 2004; Bartels e Sunkar, 2005).

O acúmulo de compostos nitrogenados em plantas é comumente relacionado à tolerância a salinidade. Existem alguns estudos sobre o acúmulo de aminoácidos livres e outros compostos nitrogenados sob estresse salino (Bartels e Sunkar, 2005). O acúmulo de compostos como aminoácidos, amidas, proteínas e poliaminas é bem relatado em algumas espécies. Os aumentos do conteúdo de glicina-betaína e prolina também ocorrem durante condições de estresse. Estes

compostos atuam no ajuste osmótico, proteção de macromoléculas celulares, estocagem de nutrientes, manutenção do pH celular, desintoxicação de células e minimização dos efeitos das espécies reativas de oxigênio (Bartels e Sunkar, 2005).

Os polióis são alcoóis polihídricos (Clark et al., 2003), que apresentam um número considerável de cadeias de carbono produzidas a partir da assimilação de CO2, e que executam algumas funções no metabolismo da planta, tais como, a formação de chaperonas, a osmorregulação e minimização do efeito de espécies reativas de oxigênio (Smirnoff e Cumbes, 1989). Existem formas de polióis acíclicas (manitol, glicerol e sorbitol) e cíclicas (pinitol e ononitol). Em geral, os polióis se acumulam no citoplasma de algumas halófitas, evitando distúrbios osmóticos causados pela elevada concentração de íons (Clark et al., 2003). Estes polióis podem ainda ser úteis no estoque do carbono sob condições ambientais adversas (Bartels e Sunkar, 2005). O manitol é um álcool polihídrico, que atua como osmólito para minimizar o efeito da salinidade, sendo este fato comprovado em estudos relacionando o acúmulo deste álcool com a tolerância à salinidade (Chaves e Oliveira, 2004). O pinitol é outro álcool polihídrico, que é sintetizado a partir de mio-inositol, tendo papel importante no ajuste osmótico intracelular entre o vacúolo e o citoplasma, além de atuar como redutor de espécies reativas de oxigênio. O acúmulo de pinitol tem sido registrado em plantas que habitam regiões costeiras como, Honkenya peploides e Sesbania aculeata, guando expostas à salinização (Chaves e Oliveira, 2004).

Dentre os vários compostos osmóticos orgânicos, os açúcares apresentam mais de 50 % do potencial osmótico total em glicófitas submetidas à salinização. Açúcares como glicose, frutose e sacarose atuam na osmoproteção, ajuste osmótico e estoque de carbono (Chaves e Oliveira, 2004; Bartels e Sunkar, 2005). Os açúcares atuam ainda como sinalizadores celulares interagindo com outras moléculas, como hormônios, modulando o metabolismo celular durante o estresse. O metabolismo do carbono é afetado pela concentração de açúcares. O aumento de sacarose na folha é correlacionado à inibição da fotossíntese por feedback, sendo este um dos fatores que explicam a redução da taxa fotossintética durante o estresse salino (Chaves et al., 2008). A síntese de amido tende a diminuir durante o estresse abiótico, sendo acelerado o processo de quebra deste para liberação de sacarose para ajustamento osmótico e como fonte

de energia. A síntese e acúmulo de sacarose são determinados pelo balanço entre a atividade da enzima, sacarose sintase, e da enzima invertase que metaboliza a sacarose em frutose e glicose. Os açúcares ainda estão envolvidos no balanço de espécies reativas de oxigênio e em respostas ao estresse oxidativo em plantas (Couée et al, 2006). Um grande número de genes responsivos a estresses é induzido por glicose, indicando a participação de açúcares nas respostas a estresses ambientais (Camoni et al, 2006; Mito et al, 1996; Rolland et al, 2006).

2.1.2.3 Redução do estresse oxidativo

Uma das conseqüências do estresse salino é o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os danos causados pelas EROs podem ser minimizados por duas formas: (1) por meio de enzimas de varredura de radicais livres como superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), a guaiacol peroxidase (GPX), e enzimas do ciclo ascorbato/glutationa (Asada, 1992; Chaves e Oliveira, 2004) e; (2) um sistema não-enzimático composto por moléculas antioxidantes, como ácido ascórbico, glutationa, carotenóides, tocoferol (Mittler, 2002) e compostos fenólicos (Sakihama et al., 2002).

A superóxido desmutase (SOD) participa de uma via crucial na defesa antioxidativa (Scandalios, 1993), pois catalisa a dismutação de O_2^- para H₂O₂. A enzima SOD possui três isoformas: a Cu/Zn-SOD que, em geral, é inativada por KCN e H₂O₂, ocorrendo geralmente no citoplasma e no cloroplasto; a Fe-SOD, inativada por H₂O₂, e resistente a KCN, ocorrendo no cloroplasto; e a Mn-SOD, resistente a H₂O₂ e KCN, e presente nas mitocôndrias (Bowler et al., 1992; Del Rio et al., 1998). Vários trabalhos têm relatado aumento nas concentrações de superóxido e, conseqüentemente, da atividade SOD sobre diferentes condições de estresse (Jiang e Zhang, 2001).

A enzima catalase (CAT) realiza a remoção de H_2O_2 (Foyer et al., 1994). Estas são encontradas no citoplasma, mitocôndria e peroxissomos de células animais, vegetais e microrganismos, atuando como reguladores dos níveis de H_2O_2 , os quais são decompostos em H_2O e O_2 (Williamson e Scandalios, 1992; Guan e Scandalios, 1998). As peroxidases, entre elas a ascorbato peroxidase e a guaiacol peroxidase (GPX), são encontradas como várias isoformas em plantas e estão localizadas em diferentes compartimentos (principalmente na parede celular e no vacúolo). Estas decompõem H_2O_2 por oxidação de co-substratos, tais como, compostos fénolicos e outros metabólitos antioxidantes, como o ácido ascórbico.

As plantas, quando sujeitas a estresses ambientais têm o balanço entre a produção de EROs e atividade de antioxidantes aumentada, resultando em prejuízos oxidativos (Sminorff, 1993). Plantas com elevados níveis de antioxidantes, constitutivos e induzidos, têm mostrado maior resistência ao estresse oxidativo. De um modo geral, a atividade das enzimas antioxidativas, como a catalase, superóxido desmutase, guaiacol peroxidase, glutationa redutase e ascorbato peroxidase é aumentada durante o estresse salino (Williamson e Scandalios, 1992; Guan e Scandalios, 1998).

2.1.2.4- Balanço entre absorção e dissipação de luz: A fluorescência da clorofila a

A medição da fluorescência da clorofila *a* é um método não-destrutivo e muito sensível para estimar o funcionamento do fotossistema II (FS II). A estimativa do desempenho funcional do FSII pode ser monitorada pelas características da fluorescência, como a fluorescência inicial (F_0), a fluorescência máxima (F_m), a fluorescência variável (F_v), o redimento quântico máximo potencial do FSII quando os centros de reação estão oxidados (F_v/F_m), o rendimento quântico efetivo (Fv'/Fm'), os "quenchings" fotoquímico (qP) e não-fotoquímico (qN e NPQ) e, finalmente, a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (Krause e Weiss, 1991). Esse método pode ser utilizado para determinar os efeitos de diversos estresses no funcionamento do aparelho fotossintético (Krause e Weiss, 1991; van Kooten e Snel, 1900).

A fluorescência inicial (F_0) indica a intensidade da fluorescência com todos os centros de reação do FSII "abertos". Ele é obtido após deixar a folha no escuro por um período mínimo de 30 minutos. Com o pulso de luz, ocorre o "fechamento" do centro de reação pela redução do receptor de elétrons, plastoquinona A (Q_A), resultando no aumento da emissão da fluorescência, desde F_0 até um pico, a fluorescência máxima (F_m). O F_m representa a completa redução de Q_A (van Kooten e Snell, 1990). A diferença entre F_m e F_0 é denominada fluorescência variável (F_v). A taxa F_v/F_m, calculada a partir dos valores obtidos (F_v/F_m = F_m-F₀/F_m), é uma característica importante para avaliar o estado do aparelho fotossintético. A razão F_v/F_m repersenta o rendimento quântico máximo potencial do FSII que mede o potencial de dissipação fotoquímica de energia e é um excelente indicador do efeito do estresse ambiental. Esse valor mostra-se proporcional à eficiência fotoquímica máxima do FSII, bem como tem correlação com a taxa fotossintética líquida em folhas intactas. Um baixo valor indica que os centros de reação do FSII podem estar danificados. Os valores esperados para a relação F_v/F_m, na ausência de estresse, estão entre 0,75 e 0,85 (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989).

Durante circunstâncias normais ou sobre estresse o balanço entre absorção e utilização da energia é necessário de forma a minimizar danos causados por foto-oxidação. Uma das formas de analisar danos no aparato fotossintético durante o estresse é analisar os "quenchings". Os "quenchings" são dissipadores de energia e são representados de duas formas: o quenching fotoquímico (qP) e o não-fotoquímico que pode ser expresso com qN ou NPQ (Krause e Weiss, 1991; van Kooten e Snel, 1900). O qP representa a energia utilizada para processos fotoquímicos, já o qN e NPQ representam a dissipação do excesso de luz na forma de calor, realizada pelo ciclo das xantofilas. A dissipação do excesso de luminosidade regula e protege a fotossíntese durante estresses ambientais, quando a absorção excede à capacidade da utilização da luz (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989; Krause e Weis, 1991).

O qP é calculado a partir pela fórmula: qP= (Fm-Ft) /(Fm- Fo), onde Ft corresponde à fluorescência quando os processos de transporte de elétrons e as reações bioquímicas de redução do carbono acopladas estão equilibrados. Para calcular o qN é necessário a utilização do F₀, ou seja, leva-se em conta a fluorescência que ocorre no FSII, conforme mostra a fórmula: qN= Fm – Fm/Fm – F₀. Já para o cálculo de NPQ não é utilizada a fluorescência inicial sendo calculado por meio da fórmula: NPQ= Fm – Fm'/Fm – Fm'/ Fm inicial sendo calculado por meio da fórmula: NPQ= Fm – Fm'/Fm – Fm' sido mostrado que NPQ é ótimo indicador da dissipação do excesso de energia luminosa, sendo um parâmetro muito utilizado para determinação de danos causados pelo estresse (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989; Krause e Weis, 1991),

O qP é igual a 1 quando todo o centro de reação está aberto, no estado oxidado. Com a emissão de luz actínica suficientemente forte, o F_m é atingido

aonde Q_A tornar-se completamente reduzida e o qP é praticamente zero. Após a aplicação de um novo pulso de luz suficientemente forte, o valor de F_m não mais retorna ao valor máximo, mesmo com a aplicação de novos pulsos, provocando, então, a redução seqüencial do qP e um aumento no qN. O aumento de qN pode indicar um baixo consumo de ATP e baixa disponibilidade de NADPH para o ciclo de Calvin, resultando em um aumento na energização da membrana tilacoidal. A análise dos "quenchings" possibilita fazer inferências sobre danos no aparato fotossintético e na assimilação de carbono (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989; Krause e Weis, 1991).

2.2- Sinalização: ABA, Óxido nítrico

2.2.1 Ácido Abscísico (ABA)

O ácido abscísico (ABA) está envolvido em vias de transdução de sinais que regulam a expressão de muitos genes durante estádios específicos de desenvolvimento ou em condições de estresse ambiental (Nambara et al., 1998; Shinozaki e Yamaguchi-Schinozaki, 1997; Siddiqui et al., 1998).

O ABA participa de diversos processos fisiológicos nas plantas, incluindo estimulação de movimentos estomáticos, acúmulo de prolina e inibição de crescimento da parte aérea (Bartels e Sunkar, 2005). Este hormônio parece suavizar o efeito inibitório de NaCl sobre a fotossíntese e a translocação de assimilados (Chaves et al., 2008). É um dos responsáveis pela alteração de genes induzidos pelo estresse salino, sendo considerado o hormônio mais intimamente ligado aos estresses (Siddiqui et al., 1998).

Este fitormônio é um sesquiterpeno sintetizado a partir da oxidação de zeaxantina e anteroxantina à violaxantina pela enzima zeanxantina epoxidase (ZEP), etapa que ocorre nos plastídios. A violaxantina é convertida em 9-cis epoxicarotenoide (9-cis noxantina) e oxidada pela dioxigenase 9-cis-epoxicarotenoide (NCED) à xantonina. A xantoxina é convertida a aldeído abscísico pela xantoxina oxidase que é oxidada para formação do ABA pela enzima aldeído abscísico oxigenase (AAO) no citosol (Taylor et al., 2000; Xiong, e Zhu, 2003). O esquema da síntese de ABA está representado na figura 1.

Durante o déficit osmótico, as concentrações de ABA aumentam em raízes e folhas em conseqüência de fatores de transcrição que induzem o aumento da expressão de vários genes relacionados à síntese de enzimas da rota de produção do ABA como o gene que sintetiza NCED e AAO (Thompson et al., 2000). Durante o estresse osmótico a biossíntese de ABA é induzida pela perda da turgescência, em raiz ou nas células guarda e o transporte é realizado pelo xilema, da raiz para folhas, e floema, do local de síntese nas folhas para outras regiões deste órgão (Davies e Zhang, 1991; Liang et al., 1996; Sauter et al., 2002).



Figura 1: Rota Metabólica do ácido abscísico (esquema adaptado de Xiong e Zhu, 2003).

O ABA é um ácido fraco que se apresenta na forma não dissociada (protonado) ABAH ou na forma inativa conjugada (ácido abscísico glicose éster) (Sauter e Hartung 2000; Sauter et al., 2002). A forma protonada se difunde pela membrana plasmática para o interior da célula deixando de estar disponível no apoplasto para que ocorra o fechamento estomático, uma vez que o local de ação do ABA localiza-se na superfície externa das células (Hartung, 1983). Durante o

estresse osmótico, o pH da seiva do xilema torna-se mais alcalino favorecendo a produção da forma dissociada do ABA que não consegue atravessar as membranas, favorecendo, portanto a redução de sua entrada nas células e acúmulo no apoplasto no qual mais células guarda são atigindas (Chaves et al., 2008).

Este hormônio além de gerar respostas adaptativas ao estresse osmótico, como a redução no fechamento estomático, é relatado como componente da via de sinalização durante o estresse oxidativo, sendo responsável pela indução da atividade e /ou aumento da expressão de genes que sintetizam algumas enzimas antioxidantes (Jiang e Zhang, 2001; Jing e Zhang, 2003). Alguns autores relatam que o ABA é responsável pelo aumento da concentração de H₂O₂ (Guan e Scandalios, 2000; Jing e Zhang, 2001) e O²⁻ (Jing e Zhang, 2001) induzindo a expressão de Cu, Zn- SOD (Sakamoto et al., 1995), Mn-SOD (Zhu e Scandalios, 1998; Bueno et al., 1998), CAT (Williamson e Scandalios, 1992; Guan e Scandalios, 1998) e a atividade de SOD, CAT, guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e glutationa redutase (GR) (Anderson et al., 1994; Bueno et al., 1998; Bellaire et al., 2000). Estudos prévios mostraram que o cálciocalmodolina (CaM), NADPH oxidase e H_2O_2 são requeridos pelo ABA para induzir o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Jiang e Zhang, 2001; Jiang e Zhang, 2002; Jiang e Zhang, 2003; Hu et al., 2005; Hu et al., 2007; Zhang et al., 2006).

2.2.2 Mutantes hormonais

As plantas mutantes são ferramentas essenciais para o estudo da participação dos hormônios em rotas de sinalização. Estes modelos para estudos, têm sido desenvolvidos há décadas e têm auxiliado a desvendar a ação hormonal na regulação de processos fisiológicos.

2.2.2.1 Tomateiro mutante (sitiens)

O tomateiro s*itiens* consiste em uma planta mutante deficiente na produção de ABA. Foi criado a partir de mutações pontuais produzidas por tratamento com raios X, que afetam a síntese da enzima aldeído abscísico oxigenase (AAO). A

AAO catalisa a oxidação da cadeia lateral do ABA aldeído e fornece o grupo carboxílico do ácido. A deficiência na oxidação do aldeído de ABA gera acúmulo de 2-trans-ABA álcool ao invés de ABA (Parry et al., 1988).

As plantas mutantes na produção de ABA germinam precocemente e possuem o desenvolvimento vegetal mais lento (Tal, 1966; Spollen et al., 2000; Nagel et al., 1994). As folhas possuem tamanho reduzido e apresentam epinastia, explicada pela alta concentração de etileno (Spollen et al., 2000; Sharp e LeNoble, 2002).

O mutante *sitiens* possui uma quantidade maior de estômatos e estes permanecem abertos mesmo no escuro ou após o tratamento com acetato de fenilmercúrio, uma substância que causa em plantas normais o fechamento estomático. Portanto, possuem alta condutância estomática e altas taxas de transpiração por área foliar (Tal, 1966). O conteúdo relativo de água nas folhas, o turgor celular e a condutância hidráulica são reduzidos em comparação a planta silvestre (Tal, 1966; Nagel et al., 1994).

2.2.3 Óxido nítrico (ON)

O óxido nítrico (ON) foi descoberto por Joseph Priestley em 1772 e por dois séculos esta substância foi considerada apenas como tóxica. Em 1980, Furchgott e Zawadzki reportaram que uma substância seria responsável pelo relaxamento dos músculos do endotélio, entretanto ainda não sabiam que substância promovia tal efeito. Em 1987, Palmer e colaboradores sugeriram que esta substância seria o ON produzido pela oxidação de L-arginina a L-citrulina. Em 1992, a Revista *Science* nomeou o ON como "a molécula do ano" por sua importância biológica (Koshland, 1992).

Robert F. Furchgott, Loius J. Ignarro e Ferid Murad receberam em 1998 o premio Nobel em Fisiologia e Medicina pela descoberta do papel do ON como molécula sinalizadora no sistema cardiovascular. Após as primeiras descobertas, o ON tem sido identificado como molécula crucial em diversos processos fisiológicos e metabólicos envolvidos com a ativação da síntese de GMPc, entre eles, a manutenção da pressão arterial, atuando como vasodilatador, sendo utilizado em medicamentos do controle da pressão arterial, na estimulação do sistema imunológico, na regulação da transmissão neuronal, na expressão de

genes, no relaxamento muscular, nas sinalizações cerebrais que envolvem o aprendizado e a memória, na morte celular (citotóxico) e na proteção celular (citoprotetor) (Moncada et al., 1991; Lipton et al., 1993; Stamler, 1994).

Em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão, o ON é um gás. Sua solubilidade é moderada em água, sendo muito mais solúvel em solventes apolares, tais como hexano. Desta forma, quando presente em sistemas biológicos, o ON tende a se concentrar em ambientes lipofílicos, como membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas. Possui um tempo de vida curto nos sistemas biológicos que estão na ordem de 5 a 15 segundos (Lancaster, 1997). O ON é encontrado em três formas, o radical óxido nítrico (ON), o cátion (ON^{+}) e o anion (ON^{-}) (Stamler et al., 1992; Wojtaszek, 2000).

O ON possui uma alta reatividade, especialmente com o oxigênio molecular (O_2) e o ânion superóxido (O_2^-) , podendo também complexar-se com metais de transição, como o ferro. A reação com o O_2^- em solução aquosa leva a formação de peroxinitrito (ONO_2^-) , o qual, em pH neutro, é protonado rapidamente, formando o ácido peroxinitroso (HONO₂). Este, por sua vez, é instável e decompõe-se espontaneamente em dióxido de nitrogênio, radical hidroxila e íons nitrato. Embora o ON e o O_2^- não sejam considerados oxidantes fortes, ONO_2^- , assim como as moléculas oriundas de sua decomposição, são oxidantes potentes capazes de iniciar a peroxidação de lipídios, oxidando tióis ou lipídios solúveis antioxidantes (Darley-Usmar et al., 1995).

O radical óxido nítrico (ON) vem emergindo como uma molécula fundamental também no reino vegetal, atuando como um mensageiro biológico, mediando os efeitos dos hormônios e de outras moléculas sinalizadoras preliminares (Neill et al., 2003; Neill et al., 2008; Wilson et al., 2008). Foi relatado que o ON participa da modulação de sinais de transdução em vias metabólicas de células vegetais afetando os níveis de mensageiros secundários como o GMPc , ADPRc e Ca⁺² (Durner et al., 1998; Pagnussat et al., 2004).

Em animais, a óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a formação de ON por meio da oxidação da L-arginina em L-citrulina (Wang e Marsden, 1995).Três classes de enzimas NOS foram identificadas em células de mamíferos, duas com expressão constitutiva (eNOS, forma endotelial e nNOS, forma neuronal) e a terceira a iNOS que é induzida por patógenos.

Nas plantas o ON é produzido por reações enzimáticas e não enzimáticas. Uma das vias de síntese de ON nas plantas dependente da redutase do nitrato (RN), por meio da redução de nitrito para ON usando NADPH como doador de elétrons. Outra enzima responsável pela produção de ON, mas com pouca relevância, é a nitrito redutase (Ni-NOR) (Desikan et al, 2002, Stöhr et al., 2001; Rockel et al. 2002; Stöhr e Stremiau, 2006). Esta enzima é encontrada em membrana plasmatica e utiliza o citocromo c como doador de elétrons. A *AtNOS1* é uma enzima produtora de ON recentemente descoberta em *Arabidopsis*. Possui seqüência de aminoácidos similar à existente no caramujo *Helix pomata* (Guo et al., 2003), entretanto, não foi observado homologia entre esta proteína e as encontradas em mamíferos. A sua atividade é dependente de NADPH e Ca⁺² semelhante a eNOS e a nNOS, não havendo regulação em nível transcricional e sim pós-transcricional mediada pelo Ca⁺² (Guo et al., 2003). O termo NOS tem sido substitido por NOA, já que esta enzima parece ser associada à produção de ON e não está diretamente ligada à sua produção (Crawford et al., 2006).

O ON pode também ser produzido por reações não enzimáticas, como a redução de nitrito no apoplasto por acidificação do pH em resposta à giberelina e ao ABA ou, por meio de reação química na presença de carotenóides e luz (Bethke et al., 2004; Stöhr e Ullrich, 2002).

A molécula de ON tem-se revelado capaz de influenciar vários processos em vegetais como crescimento de raízes (Gouvêa et al., 1997; Correa-Aragunde, et al., 2004), germinação de sementes (Beligni e Lamattina, 2000), fotomorfogênese (Pagnussat et al., 2003), lignificação de parede celular (Ferrer e Ros Barceló, 1999), senescência (Magalhães et al., 2000), movimento de estômatos (Neill et al., 2002; Garcia-Mata et al., 2003), via de sinalização por citocinas (Scherer e Holk, 2000; Tun et al., 2001), aumento da disponibilidade de ferro (Graziano et al., 2002), acúmulo de ferritina mediado por ferro (Murgia et al., 2002), morte celular (Pedroso et al., 2000), funcionalidade mitocondrial (Zottin et al., 2002) e de cloroplastos (Takahashi e Yamasaki, 2002), sinalização durante injúria (Orozco-Cárdenas e Ryan, 2002; Huang et al., 2004), defesa contra patógenos (Noritake et al., 1996, Durner et al.,1997; Delledonne et al., 1998, Delledonne et al., 2001, Yamamoto et al., 2003) e como sinalizador celular durante estresse hídrico, salino e de calor (Garcia-Mata e Lamattina , 2001; Zhang et al., 2006; Song et al., 2006). O ON é relatado como mediador de respostas hormonais em particular mediando efeitos de hormônios e moléculas envolvidas em estresses abióticos. Recentemente, o ON foi relatado como indutor de tolerância ao déficit hídrico, por atuar como mensageiro secundário de ABA durante o fechamento estomático, por aumentar a síntese de proteínas LEA e induzir enzimas antioxidantes (Garcia-Mata e Lamattina, 2001; Garcia Mata e Lamattina, 2002; Lamotte et al., 2004; Lamote et al., 2006; Tian e Lei, 2006). Durante o fechamento estomático, foi observado que o ON atua regulando canais de cálcio, K⁺ e Cl⁻ por intermédio de GMPc e ADPRc e por nitrosilação de proteínas (Garcia-Mata e Lamattina, 2001; Garcia-Mata e Lamattina, 2002; Lamotte et al., 2004;

O papel do ON no fechamento estomático tem sido bastante discutido, e conta com algumas respostas que direcionam a ação desse gás a algo próximo da mimetização da ação do fitormônio ABA. O ABA pode alterar o fechamento estomático devido ao aumento na concentração de Ca^{2+} e alcalinização do citoplasma e inibição da H⁺-ATPase, refletindo na inativação de canais de absorção de K⁺, e ativação de canais de liberação de K⁺ e ânions (Sokolovski et al., 2005). De maneira interessante foi observado que, através de nitrosilação, o ON bloqueia diretamente o canal de liberação de K⁺ em células guarda (Sokolovski e Blatt, 2004). Aparentemente, o fechamento estomático induzido pelo ABA pode ser suprimido por inibidores da ação do ON, enquanto que doadores de ON poderiam induzir o fechamento estomático mesmo na ausência de ABA (Neill et al., 2002; Garcia-Mata e Lamattina, 2002). De fato parece que o fechamento estomático é dependente do ON. Mas esse seria produzido via RN, sendo dependente também de ABA e H₂O₂ (Bright et al., 2006).

Alguns estudos sugerem que o ON participa da via de indução de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e APX induzida por ABA, entretanto, há estudos que sugerem não haver indução de APX e CAT com o tratamento com ON (Murgia et al., 2004). Zhang et al., (2007), relatam que o ABA induz a produção de H_2O_2 e que este é responsável pelo acréscimo de ON e indução das enzimas antioxidantes. Entretanto, a interação e dependência de ABA para indução de enzimas antioxidantes por ON é pouco relatada.

O ON tem sido relatado como indutor de tolerância em plantas ao estresse induzido por NaCl e por calor (Zhang et al., 2007; Song et al., 2006). Zhao et al., (2004) observaram que o ON foi capaz de induzir a atividade e a expressão de H⁺-ATPases do tipo P em calos de *P. communis* Trin., acarretando um aumento da razão K⁺/Na⁺. Estudo semelhante foi realizado por Zhang et al., (2006), no qual os autores sugerem que o ON aumenta a resistência ao sal pelo aumento do transporte de H⁺, da atividade de V-ATPases, V-PPases e do antiporte Na⁺/H⁺ em folhas de milho. Recentemente, foi demonstrado que a atividade e a expressão da P-ATPase, induzida por H₂O₂ e mediada por NO, é uma das características responsáveis pela resistência ao estresse salino (Zhang et al., 2007).

3- TRABALHOS

A MODULAÇÃO DE BOMBAS DE PRÓTONS E DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO É MEDIADA POR ÓXIDO NÍTRICO.

Mirella Pupo Santos¹, Daniel Basílio Zandonadi², Arnoldo Rocha Façanha², Ricardo Bressan-Smith¹

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal - LMGV, Setor de Fisiologia Vegetal. ²UENF-, Centro de Biociências e Biotecnologia- CBB, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual. Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28013-620, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

Palavras-chave: óxido nítrico, bombas de prótons, estresse salino
Resumo

O óxido nítrico (ON) participa de vias de sinalização em plantas, sendo considerado indutor de respostas de defesa a estresses abióticos. O presente trabalho teve como objetivo verificar se a modulação de bombas de prótons e de enzimas antioxidantes durante o estresse salino é mediada pelo ON. O tratamento salino reduziu drasticamente a massa de raiz fresca em 38 %. Nas plantas tratadas com NaCl+SNP a redução foi pequena. O número de raízes laterais foi reduzido em cerca de 50 % pelo tratamento NaCI e aumentado em quase 3 vezes pelo tratamento com SNP. O conteúdo de MDA aumentou com o tratamento salino, já o tratamento salino feito em conjunto ao SNP reduziu os níveis de peroxidação lipídica. Os tratamentos com NaCl e SNP aumentaram a atividade das enzimas antioxidantes CAT, APX e GPX. O ON foi detectado nos tecidos usando-se a sonda fluorescente DAF-2 DA. O tratamento salino induziu a produção de ON em raízes sendo possível observar aumento na fluorescência da sonda DAF-2 DA. Os tratamentos com o doador de ON, bem como o tratamento salino, aumentaram a atividade de hidrólise e transporte de prótons da P-ATPase, V-ATPase e V-PPase. Estes dados sugerem que o estresse salino induz à produção de ON e que esta molécula participa da indução de enzimas antioxidantes e modula os sistemas primários de transporte de H⁺, auxiliando na redução dos efeitos do estresse oxidativo causados pelo estresse salino.

Abstract

Regulation of proton pumps and antioxidant enzymes in response to salt stress is mediated by nitric oxide

Nitric oxide (NO) participates of the plant signalling pathways and can promote the defence responses to abiotic stresses. This study aimed to determine if the modulation of proton pumps and antioxidant enzymes during salt stress is NO-mediated. The salt treatment reduced dramatically the root and shoot development (38 %), however, when this treatment was done in conjunction with the NO donor (SNP), a reduction in the salt stress effects was observed. The number of lateral roots was diminished more than 50 % by NaCI and increased around 3-fold by

SNP. The MDA content was high due salt treatment, but SNP alleviate the salt effect reducing lipid peroxidation. Both SNP and NaCl increased the activity of antioxidant enzymes CAT, APX and GPX. NO was detected using the fluorescent probe DAF-2DA. The salt treatment enhanced NO production in roots as measured by DAF-2DA. Both NO donor and salt treatment has increased the proton transport and hydrolytic activity of P-ATPase, V-ATPase and V-PPase. The data suggest that salt stress induced the NO production, antioxidant enzymes activity and the H⁺ pumps, reducing the oxidative stress generated during the salt stress.

Key words: nitric oxide, proton pump; salt stress

Introdução

O gás óxido nítrico (ON) tem sido relatado como molécula de múltiplas funções biológicas em plantas (Lamotte et al., 2006; Neill et al., 2008; Wilson et al., 2008), incluindo a modulação do crescimento e desenvolvimento em plantas (Durner et al., 1998; Correa-Aragunde et al., 2004), estimulação de germinação de sementes (Beligni e Lamattina, 2000), e a participação no fechamento estomático (Guarcia-Mata e Lamattina, 2002; Neill et al., 2008).

O ON é sintetizado em plantas pela enzima redutase do nitrato (RN) por meio da redução de nitrito para ON (Stöhr et al., 2001; Rockel e Kaiser, 2002; Stöhr e Stremiau 2006). Uma segunda via enzimática encontrada em plantas é dependente da enzima ON sintase (NOS1), que catalisa a formação de ON por meio da oxidação da L-arginina em L-citrulina (Guo et al., 2003). Entretanto, devido a alguns questionamentos a respeito da relação direta da atividade desta com a biossíntese de ON, a enzima foi renomeada como enzima associada à biossíntese de ON (NOA1) (Crawford et al., 2006). A produção de ON também foi observada em reações enzimáticas realizadas pela Ni-NOR de membrana plasmática e por reações não enzimáticas, como a redução de nitrito no apoplasto em baixo pH na presença de um agente redutor (Stöhr e Ullrich, 2002).

Alguns trabalhos mostram a atuação do ON como mediador de repostas a estresses bióticos (Delledonne et al., 1998; Kumar and Klessing, 2000) e abióticos (Garcia-Mata e Lamattina, 2001; Song et al., 2006). A participação desta molécula

como sinalizadora durante o estresse salino tem sido recentemente estudada (Zhao et al., 2004; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2007; Zhao et al., 2007) e sua atuação está na indução de respostas que geram tolerância à planta.

A tolerância ao estresse salino está relacionada principalmente ao controle da aquisição e da alocação de íons na planta e ao controle do estresse oxidativo gerado, além de outros mecanismos como o ajustamento osmótico (Nakamura et al., 1992; De Costa et al., 2007; Kozlowski e Pallardy, 2002; Bartels e Sunkar, 2005). A exclusão de íons para o apoplasto ou alocação de íons no vacúolo é energizado por bombas de prótons capazes de criar um gradiente eletroquímico na membrana plasmática e no tonoplasto ativando transportadores secundários de íons, como o Na⁺/H⁺ (Rea e Sanders, 1987; Wang et al., 2001; Serrano e Rodriguez-Navarro, 2001) mantendo o equilíbrio iônico e osmótico na célula (Binzel e Ratajczak, 2002; Gévaudant et al., 2007; Janicka-Russak e Klobus, 2007).

A salinização do solo provoca alterações no metabolismo da planta, incluindo redução do potencial hídrico, da assimilação de CO₂ e de nutrientes, desbalanço iônico e toxidez (Bartels e Sunkar, 2005; Debouba et al., 2007). Como resultado do estresse, há alterações na fotossíntese, intensificação de processos oxidativos e inibição de diversas enzimas essenciais ao metabolismo da planta (Zhao et al., 2007; Sekmen et al., 2007; Ghanem, et al., 2008; Debouba et al., 2007). O estresse oxidativo é minimizado por compostos e enzimas antioxidantes que degradam as espécies reativas de oxigênio geradas regulando a concentração destas nos tecidos das plantas (Asada, 1992; Guan e Scandalios, 2000; Jiang e Zhang, 2001).

A modulação de bombas de prótons e enzimas antioxidantes tem sido relacionada à tolerância ao estresse salino (Kluge et al., 2003; Ayala et al., 1996; Gaxiola et al., 2001). Muitas moléculas são sugeridas como mensageiros secundários durante a via de sinalização durante o estresse salino, atuando como indutoras de tolerância, entretanto, pouco se conhece da participação do ON neste processo. O presente trabalho teve como objetivo verificar a ação do ON como molécula moduladora de bombas de prótons e de enzimas antioxidantes, bem como estimar a produção de ON durante o estresse salino em raízes.

Material e Métodos

Material Vegetal e Tratamentos

Para realizar os experimentos foram utilizadas plantas de milho Uenf (*Zea mays* L., var. Uenf 506-8). As sementes foram esterilizadas utilizando hipoclorito de sódio 1 % por 15 minutos e depois mantidas em água destilada por um período de duas horas. Logo após, foram acondicionadas em papel de germinação e mantidas em câmara de germinação com fotoperíodo de 14h de dia e 10h de escuro a 25 °C. Após 5 dias de germinação as plântulas foram transferidas para frascos contendo solução de *Hoagland* com os tratamentos ou sem (controle). As plantas foram previamente selecionadas com padrão de tamanho de cerca de 3-4 cm de comprimento da radícula antes na realização dos experimentos.

Foram realizados experimentos no qual foram coletadas plantas com um dia ou 7 dias submetidas aos tratamentos. Os tratamentos foram: 200 μ M de SNP (doador de óxido nítrico), 150 mM de NaCl, 200 μ M de SNP + 200 μ M PTIO (sequestrador de óxido nítrico), 150 mM de NaCl + 200 μ M PTIO, 300 μ M de tungstato de sódio (inibidor da redutase do nitrato) e 200 μ M L-Name.

Comprimento de raiz principal e número de raízes laterais

A arquitetura radicular foi avaliada por meio de medidas do comprimento da raiz principal e número de raízes laterais com auxilio do software Image J. Foram contadas somente raízes laterias de tamanho superior a 0,2 cm.

Determinação da massa fresca e seca

A massa da parte aérea (folhas e caule) e raízes frescas foram obtidas pela pesagem em balança analítica. A massa da parte aérea (folhas e caule) e raízes secas foram obtidas após secagem do material vegetal em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 70 °C, por 72 horas e posterior determinação em balança analítica.

Fluorescência da clorofila a

A cinética da emissão da fluorescência da clorofila *a* foi medida na terceira folha (contando do ápice para a base da planta) completamente expandida, utilizando-se um fluorímetro modulado Mini-Pam (Walz, Alemanha). As variáveis foram obtidas seguindo-se uma curva de resposta à luz, a qual tinha oito períodos consecutivos de iluminação com intensidade crescente, resultando nos seguintes parâmetros: eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm), o "quenching" fotoquímico (qP) e o "quenching" não-fotoquímico (qN) e a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR).

Determinação da Peroxidação Lipídica

A estimativa da peroxidação de lipídios das membranas de raízes e folhas foi feita pela medida do conteúdo de malondialdeído (MDA), de acordo com Dhindsa et al, (1981). Foram retiradas 5 gramas de tecido fresco e maceradas em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % na presença de polivinil polipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por dez minutos. 1 mL do sobrenadante foi retirado e adicionado a 4 mL de uma mistura formada por TCA 20 % e TBA 0,5 % (ácido tiobarbitúrico). O extrato foi submetido a 95 ^oC por 30 minutos, seguindo-se de rápido resfriamento em gelo. A amostra foi lida a 535 e 600 nm. A concentração de MDA foi determinada utilizando o coeficiente de extinção de 155 mM. cm⁻¹ e expressa em nmol.mg⁻¹ de tecido fresco.

Determinação da atividade da redutase do nitrato

Utilizou-se do método in vivo, descrito por Jaworski (1971) para determinação da atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de milho. Para tal, foram retirados discos foliares de 0,5 cm de diâmetro ou fragmentos de raízes e pesados para obtenção de 200 mg de tecido fresco. Os discos foliares ou os fragmentos de raízes foram colocados em meio de incubação, composto por tampão fosfato (pH 7,5), KNO₃, propanol e triton e submetidos ao vácuo por 3 minutos. As amostras foram levadas para o banho-maria a 30 °C por 40 minutos

com agitação constante em total obscuridade (envolto com papel alumínio). A atividade da enzima foi estimada pela quantidade de NO_2^- liberada na solução de incubação, medida em espectrofotômetro, a 540 nm, e expressa em µmoles de NO_2^- .h⁻¹.g⁻¹ de matéria fresca.

Atividade de enzimas antioxidantes

Preparação de extrato enzimático

Após cada tratamento, 1 grama de raízes foi macerada em nitrogênio líquido em gral de porcelana na presença de PVPP, na proporção de 5 % (p/v) para a concentração final de tampão a ser utilizado. Após a obtenção de um pó fino, foi acrescentado tampão na proporção de 1:4 (p/v). O tampão de extração era composto por 100 mM de fosfato de potássio, 1 mM de EDTA e 3 mM de DTT com pH ajustado para 7,5. O homogenato foi centrifugado a 15.000 g por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante coletado foi distribuído em tubos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C. A determinação do conteúdo de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Jiang e Zhang, (2001), com algumas modificações. O ensaios foram realizados utilizando o tampão fosfato 50 mM com pH 7,0 e concentração final de H_2O_2 15 mM. A reação foi iniciada com adição de 15 µL do extrato enzimático e as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro, monitorando a decomposição de H_2O_2 a 240 nm (ϵ = 36mM. cm⁻¹) durante 1 minuto, após o início da reação. O branco foi composto de meio de reação livre de H_2O_2 . A atividade da CAT foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Determinação da atividade da guaiacol peroxidase (GPX).

A atividade da GPX foi determinada por mensuração da taxa de oxidação de guaiacol a tetraguaicol por monitoramento do acréscimo, na absorvância a 470

nm (ϵ = 26,6 mM cm⁻¹), de acordo com o método usado por Zhang e Kirkham (1994), com algumas modificações. O meio de reação foi composto de 5 mM de guaiacol, 1,2 mM de H₂O₂ em 50 mM tampão fosfato de sódio pH 6,0. A reação foi iniciada com adição de 10 µL de extrato enzimático. Foi utilizado como branco o meio de reação livre de extrato enzimático. A atividade da GPX foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada de acordo com Jiang e Zhang, (2001). Para isso, o meio de reação foi preparado com, 0,5 mM de ácido ascórbico, 1 mM de EDTA, 1 mM de H₂O₂ em 50mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0. A reação foi iniciada com a adição de 30 μ L do extrato enzimático e as leituras de decréscimo de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 290 nm (ϵ = 2,8 mM cm⁻¹), monitorando a oxidação de ascorbato, tendo, como branco, o meio de reação livre de H₂O₂ e extrato enzimático. A atividade da APX foi expressa em μ mol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Determinação da atividade das bombas de H⁺

Preparação da fração microssomal

As frações microssomais contendo vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto foram isoladas do material vegetal, através de centrifugação diferencial, essencialmente como descrito por Giannini e Briskin (1987).

Após pesado, o material vegetal (2 g) foi homogeneizado em meio tamponado em gral de porcelana, onde o volume de tampão utilizado foi 1,5 vezes a quantidade de material fresco. A maceração foi processada no gelo. O tampão de extração é constituído de sacarose 250 mM, glicerol 10 %, Mops-BTP 100 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, PMSF 2 mM, 0,4 % de PVP-40T, 0,3 % BSA e 100 mM de KCl. (pH = 8,0). O homogenato foi filtrado em membrana *Miracloth* (Calbiochem). O extrato foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos a 4 °C para a remoção das células não rompidas e impurezas. O sobrenadante foi centrifugado em ultracentrífuga a 10.000 x g por 10 minutos a 2 °C para separação das

mitocôndrias (precipitado). O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 100.000 g por 40 minutos a 2 °C para obtenção da fração microssomal (membrana de vacúolo e membrana plasmática). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em meio de ressuspensão (volume de 500µL). O meio de ressuspensão foi constituído contendo glicerol 15 %, tris-HCl 20 mM (pH 7,6), 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT e PMSF 1 mM. Este material foi armazenado a -70 °C em diferentes alíquotas.

Hidrólise de ATP e PPi

As atividades ATPasicas foram determinadas colorimetricamente, consistindo na determinação de Pi liberado durante a hidrólise do ATP, segundo o método descrito por Fiske e Subbarrow (1925), com modificações propostas por Façanha e De Meis (1998). As reações foram iniciadas com a adição da proteína e finalizadas através da adição de 5 % (m:v) de ácido tricloroacético gelado. O meio de reação composto foi composto de 50 mM de Tris-BTP (pH 7,0), 100 mM de KCl, 5 mM de MgSO₄, 0,2 mM de Na₂MoO₄, 0,2 mM de Na₂VO₄⁻ e 1 mM de ATP e 30 µg de proteína por mL. A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição da mistura contendo 100 partes de molibidato de amônio 2 % em H₂SO₄ 2 % e uma parte de ácido ascórbico 1 % (proporção de 100:1). Após 5-10 minutos, realizou-se a leitura em leitor de microplaca Modelo μ Quant, Bio Tek instruments, NC, em comprimento de onda de 750 nm.

Transporte de H⁺

O gradiente de prótons foi medido monitorando a taxa de decréscimo da fluorescência (DF) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro (modelo F 4500, HITACHI, Japan). O meio de reação foi composto de 10 mM Mops-BTP (pH 7.0), 100 mM KCI, 5 mM MgSO₄, 250 mM sacarose, 2 mM ACMA, 1 mM de ATP ou PPi e 30 µg de proteína/ml. Após atingir o equilíbrio entre efluxo e influxo de prótons, utilizou-se 20 µL de FCCP ou NH₄CI para dissipar o gradiente formado. A partir dos dados obtidos foi determinada a velocidade inicial (V₀) e a variação da fluorescência máxima ($DF_{máx}$).

Detecção de ON

As imagens para detecção de ON foram realizadas com a sonda 4,5diaminofluoreceina diacetato (DAF-2 DA) em microscópio ótico de fluorescência (Zeiss Axioplan com câmera digital Canon A640 acoplada). As seções transversais da região de emissão de raízes laterais de raízes de milho tratadas por 72h (ver tratamentos no tópico *material vegetal e delineamento experimental*) foram mantidas em tampão 10 mM de Hepes-BTP pH 7,5 com 10 µM da sonda DAF-2 DA por 40 minutos. As amostras foram lavadas 3 vezes com o tampão Hepes-BTP e analisadas em seguida no microscópio (excitação: 488 nm, emissão: 495-575 nm). As imagens foram analisadas pelo programa ImageJ[™]. Cortes transversais de raízes sem adição DAF-2 DA foram utilizadas como controle negativo. As características de obtenção de imagens pela câmera foram mantidas idênticas durante a aquisição de todas as imagens e não sofreram nenhum tipo de processamento ou tratamento. Pelo menos 5 amostras foram analisadas em 4 experimentos independentes.

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições por tratamento, sendo o experimento realizado três vezes. O modelo matemático pode ser descrito como: $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, onde: $Y_{ij} =$ resposta experimental medida na unidade experimental j submetida ao tratamento i; μ = média geral; t_i = efeito relativo ao tratamento i; e_{ij} = erro aleatório. Foi realizada a análise de variância e feito o teste Dunnet (*P* < 0,05).

Resultados

Na Figura 1 pode-se observar que 150 mM de NaCI reduziu aproximadamente 50 % o crescimento do eixo principal das raízes de milho. Quando o sal foi adicionado em conjunto com o doador de ON (tratamento NaCI+SNP) este preveniu a redução do comprimento do eixo principal causada pela salinidade. O uso de tungstato (inibidor da redutase do nitrato) ou PTIO (seqüestrador de ON) inibiu o crescimento radicular em 50 % e 40 %, respectivamente.

O número de raízes laterais (RLs) foi reduzido por NaCI em 60 % e aumentado em quase 3 vezes com o tratamento com SNP. O SNP reduziu o efeito inibitório do sal na emissão de RLs (Figura 2). O tratamento com NaCI+SNP+PTIO também reduziu a emissão de RLs, resultado possivelmente atribuído ao PTIO, seqüestrador de ON.

O tratamento salino reduziu a massa de raiz fresca em quase 40 %. As plantas tratadas com NaCI e SNP tiveram uma redução de 13 % não apresentando diferença estatística das plantas controle (Figura 3 A). Em plantas tratadas com NaCI foi observada a redução de 46 % da massa da parte aérea fresca (Figura 3 B). Esta característica foi 36 % maior nas plantas tratadas com o doador de ON. Em plantas que tiveram o estresse salino combinado ao SNP não houve modificações significativas.

O tratamento com NaCl reduziu em 34 % a massa de raíz seca (Figura 4 A). O tratamento combinado NaCl e SNP minimizou em parte a redução da massa seca (Figura 4 A). Plantas que foram tratadas com NaCl tiveram redução de 40 % da massa da parte aérea seca. O uso de SNP em plantas que receberam NaCl não impediu a redução da massa da parte aérea seca (Figura 4 B).

O conteúdo de MDA em raízes aumentou em 54 % no tratamento salino, quando este tratamento foi feito em conjunto ao SNP o aumento foi de 14 % (Figura 5).

A atividade da enzima CAT não foi alterada significativamente por nenhum dos tratamentos. (Figura 6A). A enzima GPX apresentou aumento de sua atividade nos tratamentos com NaCl, SNP e NaCl+SNP de 45 %, 65 % e 79 %, respectivamente (Figura 6B). O NaCl aumentou em 72 % a atividade da APX. O tratamento com SNP aumentou também a atividade desta enzima, cerca de 75 %. Já em plantas submetidas a SNP+NaCl houve duplicação da atividade desta enzima (Figura 6C).

A taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) entre os fotossistemas PS2 e PS1 foi reduzida drasticamente pelo tratamento com NaCI durante todos os pontos analisados, havendo redução de 73 % no último ponto da curva de luz (Figura 7A). O ON reduziu significativamente a ETR, nos três últimos pontos de luz, havendo redução de 23 % no último ponto. O tratamento com SNP em conjunto ao NaCI minimizou a redução gerada pelo tratamento salino, havendo redução de 57 % no ponto de saturação luminosa (Figura 7A).

Os valores de Fv/Fm não diferiram entre os tratamentos, entretanto, os valores Fv'/Fm' foram menores nas plantas tratadas com sal em toda curva de luz utilizada, exibindo valor 73 % menor no último ponto da curva, quando comparado ao controle (Figura 7B). O tratamento com SNP manteve-se semelhante ao controle em quase todos os pontos da curva de luz, havendo redução de 55 % ao final da curva. O tratamento SNP+PTIO também reduziu os valores de Fv'/Fm', cerca de 56 % no último ponto da curva de luz. O tratamento salino em combinação ao ON manteve os valores de Fv'/Fm' maiores que os encontrados em plantas tratadas somente com sal, apesar de não manter este semelhante ao controle no último ponto da curva de luz avaliado, com redução de 41 % (Figura 7B).

Os resultados obtidos para o "quenching" fotoquímico (qP) (Figura 8A) mostram que os tratamentos praticamente não alteraram os valores de qP, com exceção do tratamento salino, que reduziu o qP em 7 %, não sendo esta redução significativa. Este mesmo tratamento aumentou os níveis de NPQ em 80 % (Figura 8B). O tratamento com SNP aumentou o NPQ em 46 %, entretanto esta variação não foi significativa quando comparada ao controle. O tratamento com SNP+PTIO não diferiu significativamente do controle. O tratamento salino em conjunto ao doador de ON apresentou valores de NPQ 53 % maiores que os encontrados no controle (Figura 8B).

O estresse imposto causou redução não significativa de 20 % da atividade da enzima RN em raízes (Figura 9 A). O inibidor desta enzima reduziu de forma significativa a atividade desta enzima em raízes. A atividade da RN em folhas apresentou resultados semelhantes aos encontrados em raízes, entretanto, houve a redução de 40 % da atividade desta enzima pelo tratamento salino. O tungstato inibiu em 54 % a atividade de RN em folhas (figura 9 B).

O tratamento com NaCl aumentou em 90 % a atividade hidrolítica de P-ATPase (Figura 10 A). O ON aumentou cerca de 2 vezes a atividade hidrolítica dessa enzima. O tratamento salino combinado ao SNP induziu a atividade hidrolítica desta enzima em quase 3 vezes. O Δ F do transporte de prótons (quantidade total de H⁺ transportada) de P-ATPase foi induzido 5 vezes pelo tratamento salino e 43 % por SNP. O tratamento salino+SNP aumentou o Δ F em 6 vezes. O estresse salino e o tratamento com SNP aumentaram em 2 vezes e 90 %, respectivamente a V₀ do transporte de prótons. O tratamento de NaCI+SNP foi 2,5 vezes maior que o controle.

A atividade hidrolítica de V-ATPase aumentou 94 % com tratamento salino. O SNP aumentou 70 % da atividade hidrolítica desta enzima. O tratamento com NaCI+SNP aumentou em 2 vezes a atividade da V-ATPase. O Δ F do transporte de prótons realizado por esta enzima foi 4 vezes maior no tratamento com NaCI e 70 % maior com o tratamento SNP. O tratamento com SNP e PTIO foi semelhante ao controle. O maior valor de Δ F foi no tratamento NaCI+SNP, com incremento de 4,5 vezes. A V₀ (velocidade inicial de transporte de H⁺) com tratamento salino, SNP e NaCI+SNP foi 3, 2 e 4 vezes maior, respectivamente.

Os tratamentos com NaCl ou SNP aumentaram a atividade hidrolítica de V-PPase em 32 % e 59 %. O tratamento com ambos, NaCl+SNP, aumentou a atividade em 90 %. O Δ F do transporte de prótons de PPase foi induzido pelo tratamento salino e por SNP, 2 vezes e 65 %, respectivamente. O NaCl+SNP aumentou o Δ F em 2,3 vezes. O estresse salino e o tratamento com SNP aumentaram em 2 vezes e 90 %, respectivamente a V₀ do transporte de prótons. A V₀ do tratamento foi cerca de 2 vezes superior ao controle.

Para determinação da presença de ON foi utilizada uma sonda específica que detecta a presença deste na célula (DAF-2 DA). Pode-se observar na figura 11 que o estresse salino induziu significativamente a produção de ON nas pontas de raízes de milho, cerca de 25 %. O tratamento com tungstato, inibidor da RN, uma das enzimas responsáveis pela produção de ON, resultou na redução em 15 % da fluorescência. O L-Name, outro inibidor da síntese de ON, entretanto via enzima ATNOA1, resultou na redução de 17 % da fluorescência. O seqüestrador de ON, PTIO reduziu a fluorescência em 15 %.

Discussão

A inibição do crescimento radicular e da parte aérea durante o estresse salino é muito bem documentada em muitas espécies incluindo o milho (Fortmeier e Schubert, 1995; Zorb et al., 2005; Munns, 2002). O desenvolvimento adequado de um sistema radicular é fundamental para a sobrevivência, especialmente em ambientes inóspitos ao crescimento (Deak e Malamy, 2005).

Os resultados mostram que o estresse salino reduziu de forma considerável o comprimento da raiz principal (Fig. 1), sendo isto atribuído à modificação de fatores como turgescência das células, o balanço hormonal e de nutrientes, fatores afetados durante o estresse salino (Spollen et al., 2000; Ghanem et al., 2008; Fukaki e Tasaka, 2009; De Costa et al., 2007; Debouba et al., 2007).

Houve redução da massa de raízes e parte aérea fresca e seca (Fig. 3 e 4), conseqüência provável da redução do conteúdo de água, afetando desta forma a turgescência celular e o crescimento. Os resultados mostram que a redução na massa fresca e seca foi mais pronunciada na parte aérea semelhante aos dados da literatura que sugerem que as raízes parecem suportar melhor a salinidade que a parte aérea, fenômeno este que pode estar associado a um ajustamento osmótico mais rápido e a uma perda de turgor mais lenta das raízes, quando comparadas com a parte aérea. Por ocorrer mais lentamente o ajuste osmótico nas folhas, há uma diminuição ou a parada da expansão das paredes, resultando na inibição do crescimento mais pronunciado da parte aérea (Jia et al., 2002; Hsiao e Xu, 2000).

O tratamento com o doador de ON minimizou os efeitos do estresse salino em raíz e parte aérea mantendo o comprimento da raiz principal e a massa seca e fresca próximos ao controle (Fig. 1, 2 e 3). Este efeito do ON é atribuído à capacidade de manutenção do conteúdo relativo de água por meio de ajustamento osmótico induzido por bombas de prótons e por indução de sinalizadores secundários com GMPc, canais de cálcio e MAPK relacionados a respostas ao estresse (Zhang et al., 2006; Neill et al., 2003; Durner et al., 1998, Lamote et al., 2006).

O estresse salino afeta também o metabolismo do nitrogênio reduzindo a captação de nitrato e assimilação de amônia (Debouba et al., 2006 a; Debouba et al., 2007; Chandra et al., 2001). A RN é uma enzima chave na assimilação do nitrogênio, pois participa da primeira etapa de redução do NO⁻₃ a NO⁻₂. Durante o estresse salino pode-se observar a redução da atividade desta enzima, principalmente em folhas (Fig. 9 A e 9 B). A redução da atividade da RN pela salinidade assim como de enzimas como a glutamina e glutamato sintase,

enzimas responsáveis pela conversão da amônia a glutamina e glutamato, respectivamente, leva ao decréscimo no crescimento e desenvolvimento de raízes e da parte aérea (Debouba et al., 2006a; Debouba et al., 2006b; Debouba et al., 2007). O tungstato, inibidor da RN, reduziu o crescimento da raiz principal, e a massa seca de raiz e parte aérea confirmando a relação desta enzima com o crescimento vegetal, possivelmente em função da restrição na redução de nitrato, ocasionando diminuição do suplemento de nitrogênio para planta (Fig. 1).

Além da redução da atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, a salinidade afeta o balanço hormonal principalmente entre ABA e auxina resultando em alterações do desenvolvimento radicular (Binzel e Dunlap, 1995; Ghanem et al., 2008). Durante o estresse salino há aumento da produção e acúmulo de ABA e redução de auxina nas raízes. Este fato pode ser atribuído à atividade da enzima aldeído oxidase (AO), responsável pela produção de ABA por meio da oxidação de ABA aldeído e pela produção de auxina em uma via alternativa pouco relatada por meio da oxidação de 3-indol-acetaldeído (Koshiba et al., 1996). A salinidade induz a produção de ABA, pois aumenta a atividade de AO em raízes, entretanto parece reduzir a atividade desta na parte aérea (Omarov et al., 1998; De Costa et al., 2007). A redução das concentrações de auxinas em raízes durante o estresse salino também é atribuída ao decréscimo na atividade de outras proteínas sintetizadoras e transportadoras e a redução da condutividade hidráulica (Deak e Malamy, 2005).

A salinidade reduziu a emissão de RLs (Fig. 2), sendo este fato atribuído, por alguns autores, ao balanço do efeito da auxina e de ABA na emissão de RLs durante o estresse osmótico (Deak e Malamy, 2005). Os hormônios auxina e ABA interagem na sinalização para mudanças requeridas em condições de estresse. Altas concentrações de sal inibem os níveis de auxina nas raízes, entretanto aumentam as concentrações de ABA (Dunlap e Binzel, 1996; Bartels e Sunkar, 2005). A repressão do desenvolvimento de RLs pelo efeito do estresse osmótico é mediada pelo ABA, já a emissão é estimulada por auxina (Deak e Malamy, 2005).

O radical ON atua como um mensageiro biológico, mediando os efeitos dos hormônios e de outras moléculas sinalizadoras preliminares (Neill et al., 2003). Foi relatado que o ON participa da modulação de sinais de transdução em vias metabólicas de células vegetais afetando os níveis de mensageiros secundários como o GMPc , ADPRc e Ca^{+2} (Durner et al., 1998; Pagnussat et al., 2003 Pagnussat et al., 2004).

O tratamento com ON reduziu os efeitos causados pelo sal na emissão de raízes laterais (Fig. 2). Este fato pode estar associado, entre outros fatores, à atuação do ON promovendo o crescimento radicular (Gouvêa et al., 1997). O aumento na concentração de ON parece estar envolvido na via de sinalização de auxina, aumentando os níveis de GMPc e cálcio e ativando proteínas kinases envolvidas no desenvolvimento de raízes adventícias e raízes laterais (Pagnussat et al., 2002; Pagnussat et al., 2003; Lanteri et al., 2006; Correa-Aragunde et al., 2004).

Os estresses ambientais em plantas refletem em maior geração de EROs. Danos oxidativos gerados por estresse salino têm sido freqüentemente relatados em raízes expostas a altas concentrações de sal (Hernandéz e Almansa et al., 2001; Sekmen et al., 2007). A peroxidação lipídica consiste na oxidação de lipídeos pelo H₂O₂, sendo freqüentemente usada com um indicador de estresse oxidativo em plantas submetidas à salinidade (Sekmen et al., 2007). Os resultados do presente trabalho mostram que o sal aumentou os níveis de peroxidação lipídica (Fig. 5) e o SNP minimizou estes efeitos talvez por ser capaz de induzir enzimas antioxidantes (Fig. 6).

Muitos trabalhos têm indicado que a aquisição da tolerância ao estresse salino pode ser conseqüência do controle eficiente do estresse oxidativo (Hernández e Alamansa, 2002, Bartels e Sunkar, 2005; Sekmen et al., 2007). As peroxidases são consideradas antioxidantes que protegem as células contra danos causados pelo H₂O₂. Sua alta atividade tem sido associada com a tolerância à salinidade (Bartels e Sunkar, 2005; Sekmen et al., 2007). A atividade de GPX e APX foi aumentada durante o estresse salino, entretanto a atividade de CAT não foi alterada (Fig. 6). O tratamento com doador de ON resultou igualmente no aumento destas enzimas. O ON é relatado como indutor de enzimas antioxidantes durante estresse por calor reduzindo o estresse oxidativo (Song et al., 2006), e como mediador da sinalização dependente de ABA e peróxido na ativação de MAPK envolvidas na cascata de sinalização de enzimas antioxidantes (Zhang et al., 2006).

Dentre os efeitos do estresse imposto pelo NaCl está a alteração da fotossíntese (Zhao et al., 2007). A energia capturada pela clorofila *a* pode ser

direcionada para fotoquímica, expressa por qP, emitida em fluorescência ou convertida a calor (qN e NPQ). A dissipação por calor está associada ao ciclo das xantofilas que protegem o aparato fotossintético contra o excesso de luz (Krause e Weis, 1991; Muller et al., 2001). O qP não variou com os tratamentos (Fig. 8A), entretanto, o NPQ aumentou durante o estresse salino, e no tratamento de NaCI+SNP (Fig. 8 B). Durante o estresse salino, o estresse osmótico e iônico gerado reduz a atividade de enzimas relacionadas à fotoquímica, resultando em uma maior dissipação de energia, tendo, portanto explicados os valores de NPQ acrescidos no tratamento salino.

O transporte de elétrons entre os fotossistemas é calculado pela equação que inclui a eficiência efetiva do PSII e a radiação fotossinteticamente ativa. A eficiência efetiva de PSII decresce com acréscimo da irradiação e mais elétrons acumulam no aceptor no PSII, havendo um relativo acréscimo no quenching não fotoquímico. O aumento do quenching não fotoquímico pode ser correlacionado ao decréscimo na taxa relativa de transporte de elétrons entre os fotossistemas (Ralph e Gademann, 2005). O tratamento com SNP e SNP+PTIO também reduziu o ETR, mostrando que possivelmente outras moléculas além do ON geradas na decomposição do SNP possuem efeitos na cadeia transportadora de elétrons. A cadeia transportadora de elétrons cloroplastídica possui diversas proteínas contendo metais de transição, que são moléculas alvo para ligação do ON (Yamasaki et al., 1999; Takahashi e Yamasaki, 2002). Isto explica a redução do transporte de elétrons encontrada com este tratamento. Os sítios de ação de ON encontram-se no PSII, entre a QA e QB (Diner e Petrouleas, 1990) evitando que ocorra a redução de QA, no resíduo de tirosina da proteína D2 (Sanakis et al., 1997) e no complexo de oxidação da água (Schansker et al., 2002).

O ON foi relatado como inibidor da síntese de ATP durante a fosforização oxidativa em animais (Brookes et al., 1999) e plantas (Yamasaki et al., 1999). Entretanto, visto que a inibição é temporária e a atividade das enzimas relacionadas é completamente restabelecida com a remoção do ON, a idéia de que esta molécula seja apenas um inibidor da fotofosforilação ou mesmo da fosforilação oxidativa tem sido questionada, sendo sugerido o termo regulador ou modulador para esta molécula (Yamasaki et al., 1999; Shunichi e Yamasaki, 2002).

O rendimento quântico máximo (F_v/F_m) é usado como indicador do efeito ambiental, pois mede o potencial de dissipação fotoquímica de energia, sendo proporcional à eficiência fotoquímica máxima do PSII. A curva de luz mostrou o decréscimo nos valores de Fv'/Fm' em plantas tratadas com NaCl (Fig. 7B).

Os acréscimos de NPQ encontrados no tratamento salino podem ser correlacionados ao decréscimo de ETR (Fig. 7A). Resultados semelhantes foram encontrados por Ghanem et al (2008), no qual plantas de tomate tiveram a razão Fv'/Fm' reduzida e o NPQ aumentado em função do estresse salino. O tratamento com SNP manteve os valores de Fv'/Fm' maiores nas plantas que foram tratadas com sal, entretanto este tratamento reduziu este parâmetro em alguns pontos da curva. Resultados semelhantes foram encontrados por Wodala et al (2008), no qual observaram que o doador de ON livre de cianeto, GSNO, reduziu a taxa Fv'/Fm', sendo observado também a redução de qP durante o tratamento com GSNO.

A inibição do crescimento radicular durante o estresse salino é explicada por alguns autores como o desvio de energia do crescimento para a manutenção do metabolismo e direcionando parte da energia para transporte e distribuição iônica e síntese de solutos para osmorregulação (Bartels e Sunkar 2005; Chaves et al., 2008).

Quando plantas são submetidas ao estresse salino, podem sobreviver e crescer através de processos adaptativos como a compartimentalização do sal e o transporte de íons para fora da célula. Assim, o controle do movimento de íons através da membrana plasmática e do tonoplasto para manter uma baixa concentração de Na⁺ no citoplasma é essencial para a tolerância à salinidade (Binzel e Ratajczak, 2002; Janicka-Russak e Klobus, 2007).

O estresse salino induziu a atividade hidrolítica e de transporte de prótons da P-ATPases e da V-ATPase (Fig. 10). O transporte foi mais estimulado que a hidrólise, dando uma idéia do aumento do acoplamento dessas enzimas devido à presença do sal. Esse resultado vai ao encontro das observações de Ballesteros et al (1996) no que se refere a um maior acoplamento na H⁺-ATPase do tipo P, embora esses autores tenham visto inibição da atividade hidrolítica. O estímulo das bombas de vacúolo em resposta ao sal é amplamente relatado (Hassidim et al., 1986; Barkla et al., 1995; Wang et al., 2001; Zhang et al., 2006). A atividade

da V-ATPase e da V-PPase foi aumentada pelo tratamento com NaCI assim como o transporte de H⁺, havendo maior destaque para a V-ATPase.

O uso de SNP também resultou na indução destas enzimas. A H⁺-ATPase de membrana foi ativada em mais de 3 vezes pelo ON (Fig. 10), resultado que vai ao encontro do observado por Zhao et al, (2004), que sugerem a participação do ON como molécula reguladora da atividade de P-ATPase durante o estresse salino em calos. O mesmo foi reportado por Zhang et al., (2007), que incluíram o H_2O_2 na rota de estímulo da bomba via ON. Resultado semelhante foi encontrado por Zhang et al., (2006), que demonstraram uma conexão entre a transdução de sinal do ON e o aumento da tolerância à salinidade, através da estimulação da atividade e transporte de H⁺ da V-ATPase e V-PPase em folhas de milho. Esse estímulo esteve associado ao aumento do co-transporte Na⁺/H⁺.

A RN participa de uma das vias de produção de ON nas plantas, no qual a redução de nitrito a ON é dependente de NAD(P)H (Yamasaki et al., 1999). A produção de ON pela redução do nitrito compete com a redução do nitrato a nitrito, pois a RN possui Km para nitrato de 50 μ M e nitrito de 100 μ M, sendo desta forma a produção de ON dependente da concentração de nitrato. Além da RN citoplasmática a produção de ON também está associada a enzimas ligadas a membrana (Ni-Nor) (Rockel et al., 2002). Durante condições normais, os níveis de nitrato são de 1 a 5 mM e de nitrito de 10 μ M. Nestas condições não seria esperado a produção de ON via redutase do nitrato (Crawford et al., 2006), entretanto alguns autores afirmam ser a enzima essencial na produção de ON mesmo em condições não estressantes (Desikan et al., 2002; Garcia-Mata e Lamattina, 2001). Os resultados apontam que a enzima RN participa da produção de ON em raízes de milho em condições não estressantes, uma vez que foi observada a redução da fluorescência emitida pela presença de ON pelo inibidor da atividade de RN, o tungstato de sódio (Na₂WO₄) (Fig. 11).

Durante o tratamento salino foi observado acréscimos da fluorescência emitida pela sonda DAF-2 em pontas de raíz (Fig. 11). Este fato pode ser correlacionado à indução de NADPH oxidase e produção de EROs durante o estresse salino, sendo estes fatos relacionados à indução na síntese de ON por RN e ATNOA1 (Zhang et al., 2007; Neill et al., 2008; Corpas et al, 2009).

Plantas tratadas com NaCl e tungstato de sódio, tiveram redução da fluorescência, sendo possível inferir que a RN é em parte responsável também

pelo acréscimo de ON nas raízes durante o estresse salino (Fig. 11). Entretanto, é necessário ressaltar que o tungstato de sódio também inibe a produção de ABA hormônio, que também está relacionado à indução de EROs durante o estresse salino e síntese de ON (Zhang et al, 2007). Durante o estresse salino é relatado a redução do conteúdo de nitrato em folhas e raízes de tomate e milho (Debouba et al., 2006 a; Abd-El Baki et al., 2000). Nestas condições onde há redução dos níveis de nitrato e incremento dos níveis de nitrito, possivelmente haveria aumento nos níveis de ON durante o estresse salino.

O tratamento com L-Name, inibidor da enzima NOA1, reduziu a fluorescência em condições não estressantes e, semelhante ao tratamento com tungstato, reduziu a fluorescência durante o estresse salino, mostrando que assim como a RN, a NOA1 participa da produção de ON em raízes de milho durante o estresse salino. Este resultado vem ao encontro do trabalho de Zhang et al., (2007), no qual foi observado a indução da atividade de NOA1, bem como a emissão de ON em calos de *Populus euphratica* pelo NaCl. Zhao et al., (2004) não observam alterações na emissão de ON em calos durante o estresse salino, entretanto Zhao et al., (2007) observaram a redução da fluorescência de DAF em raízes de Arabidopsis, sendo esta redução atribuída à redução da atividade de NOA 1, mesmo sem ser analisada a participação da RN neste trabalho. Já Zhang et al., (2006) observaram o aumento transiente de ON em folhas de milho tratadas com NaCl não nomeando nenhuma enzima especifica como a responsável por este aumento.

A produção de óxido nítrico durante o estresse salino possivelmente ocorre de maneira diferente na parte aérea, já que foi observado que a enzima RN é inibida pela salinidade (Fig. 9 B), sendo especulada a participação de outra forma de produção, como a realizada pela enzima NOA1.

Além das vias enzimáticas propostas para a produção de ON, existe a via não enzimática. Essa via depende da redução de nitrito no apoplasto em pH ácido e ambiente redutor (Stöhr e Ullrich, 2002). É possível que exista um papel chave das bombas de H⁺ nesse processo de acidificação, na qual a ativação da ATPase de membrana por NaCI e ON acidifica o apoplasto levando a produção de mais ON. A quantidade e o pico de produção de ON nesse processo seriam fundamentais para indução de resistência à salinidade, tanto por retro-ativar a P-ATPase e sinalizar para estimulação ou repressão da produção de mais ON, quanto para auxiliar a manutenção da exclusão de Na⁺ (ou compartimentalização no vacúolo) e absorção de K⁺.

A participação do ON durante o estresse salino em raízes foi resumida em um modelo proposto com base nos resultados obtidos neste trabalho (Figura 12)

Conclusão

Neste trabalho foi possível verificar a minimização dos efeitos da salinidade em raíz e parte aérea pelo tratamento com o doador de ON. O tratamento com SNP induziu a atividade de enzimas antioxidantes possibilitando a redução da peroxidação lipídica em raízes. Foi verficado aumento da produção de ON durante o estresse salino, sendo esta produção atribuída principalmente a RN e possivelmente a NOA 1. O tratamento com o doador de ON induziu também a atividade de P-ATPase, V-ATPase e PPase, comprovando a hipótese da participação desta molécula na modulação de bombas de prótons. Estes dados sugerem que durante o estresse salino há aumento da produção de ON e que esta molécula participa da via de indução de enzimas antioxidantes e modula os sistemas primários de transporte de H⁺, auxiliando desta forma na redução do estresse oxidativo e osmótico promovidos pela salinidade.

Há a necessidade de novos estudos para confirmar a participação das enzimas envolvidas na produção de ON, bem como avaliar a via não enzimática de produção de ON durante o estresse salino. É necessário também investigar se a resposta na modulação das bombas durante o estresse salino é dependente da presença de ON, ou seja, se esta molécula atua como sinalizador modulando as ATPases e PPase durante o estresse salino.

Referencias Bibliográficas

- Abd-ElBaki, G.K., Siefritz, F., Man, H.M., Weiner, H., Haldenhof, F. R., Kaiser, W.M. (2000) Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell and Environment*, 23:515-521.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 235-241.

- Ayala F., O'Leary, J.W., Schumaker, K.S. (1996) Increased vacuolar and plasma membrane H⁺-ATPase activities in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCI. *Journal of Experimental Botany*, 47: 25-32.
- Barkla, B.J., Zingarelli, L., Blumwald, E., Smith, J. (1995) Tonoplast Na+/H+ antiport activity and Its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiology*, 109: 549-556.
- Bartels, D., Sunkar, R. (2005) Drougth and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24:23-58.
- Beligni, M. V., Lamattina, L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210:215-21.
- Binzel, M.L., Dunlap, J.R. (1995) Abscisic acid does not mediate NaCl-induced accumulation of 70-Kda subunit tonoplast H+-ATPase message in tomato. *Planta*, 197:563-568.
- Binzel, M.L., Ratajczak, R. (2002) Function of membrane transport systems under salinity: tonoplast. In: Salinity: Environment - Plants - Molecules. A Lauchli, U Luttge (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp 423-450.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, 72:255-260.
- Brookes, P.S., Bolanos, J.P., Heals, S.J.R. (1999) The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct. *FEBS Lett*, 446: 261-263.
- Chandra, A.S., Kumar, S.S., Nibedita, S. (2001) NaCl- stress induced alteration in glutamine synthetase activity in excised senescing leaves of a salt-sensitive and salt –tolerance rice cultivar in light and darkness. *Plant Growth Regulation*, 34: 287-292.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2008) Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation Mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 3:1-10.
- Corpas, F. J., Hayashi, M., Mano, S., Nishimura, N. Barroso, J, B. (2009) Peroxisomes are required for *in vivo* nitric oxide (NO) accumulation in the cytosol following salinity stress of Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 25: 1-10.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218: 900-905.

- Crawford, N.M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y.M., Okamoto, M. Mack, A. (2006) Response to Zemojtel et al.: Plant nitric oxide: back to square one. *Trends in Plant Science*, 11: 26-527.
- Debouba, M., Gouia, H., Ghorbel, M.H. (2006 b) NaCl effects, growth, ions and water status of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedling. *Acta Botanica Gallica*, 153:297-307.
- Debouba, M. Gouia, H., Suzuki, A., Ghorbel, M.H. (2006 a) NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato *Lycopersicon* esculentum seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 163: 1247-1258.
- Debouba, M., Maaroufi-Dghimi, H., Suzuki, A., Ghorbel, M. H., Gouia, H. (2007) Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. *Annals of Botany*, 99: 1143-1151.
- Deak, K. I., Malamy, J. (2005) Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal*, 43:17-28.
- De Costa, W., Zorb, C., Hartung, W., Schubert, S. (2007) Salt resistence is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiologia Plantarum*, 131:311-321.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A, Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394:585-588.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., Neill, S. (2002) A new role for and old enzyme: nitrate reductase –mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceediings of the National Academy of Sciences*, 99: 16314-16328.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A. (1981) Leaf senescence: correlatated with increases levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreases levels of superoxide dismutase and catalase. *Jounal of Experimental Botany*, 32:93-101.
- Diner, B.A., Petrouleas, V. (1990) Formation by NO of nitrosyl adducts of redox components of the photosystem II reaction center. II:Evidence that HCO₃⁻ / CO₂ binds to the aceeptor-side non-heme iron. *Biochim Biophts Acta*, 1015: 141-149.
- Dunlap, J.R., Binzel, M.L. (1996) NaCl reduces indole-3-acetic levels in roots of tomato plants independent of stress-induced abscisic acid. *Plant Physiology*, 112: 379-384.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:10328-10333.

- Façanha, A.R, De Méis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺pyrophosphatase in tonoplast cesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology*, 116: 1487-1495.
- Fiske, C.F., Subbarow, Y. (1925) The colorometric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66: 375.
- Fortmeier, R., Schubert, S. (1995) Salt tolerance of maize (*Zea mays* L): the role of sodium exclusion. *Plant Cell Environment*, 18: 1041-1047.
- Fukaki, H., Tasaka, M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol*, 69:437-449.
- Garcia-Mata, C., Lamattina, L. (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126:1196–1204.
- Gaxiola, R.A, Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., Fink, G.R. (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺- pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 11444-11449.
- Gevaudant, F., Duby, G., von Stedingk, E., Zhao, R., Morsomme, P., and Boutry, M. (2007) Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. *Plant Physiology*, 144: 1763–1776.
- Ghanem, M. E., Albacete, A., Martinez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R.; Dodd, I.C., Lutts, S., Pérez-Alfocea, F. (2008) Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal* of Experimental Botany, 23:1-12.
- Giannini, J. L.; Briskin, D. P. Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*, 84:613. 1987.
- Gouvea, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhães, M.I.S. (1997) NO releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Reglation*, 21:183-187.
- Guan, L., Scandalios, J.G. (2000) Cis-elements and transfactors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H2O2 is likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal*, 22: 87–95.
- Guo, F.Q., Okamoto, M., Crawford, N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302:100-103.
- Hassidim, M., Braun, Y., Lerner, H.R., Reinhold, L. (1986) Studies on H-Translocating ATPases in Plants of Varying Resistance to Salinity: II. K

Strongly Promotes Development of Membrane Potential in Vesicles from Cotton Roots. *Plant Physiology*, 81: 1057-1061.

- Hernandez, J.A., Almansa, M.S. (2002) Short'term effects of salt stress on antioxidant system and leaf water relations of peã leaves. *Physiologia Plantarum*, 155:251-257.
- Hsiao, T.C., Xu, L. K. (2000) Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1595-1616.
- Janicka-Russak, M., Klobus, G. (2007) Modification of plasma membrane and vacuolar H+-ATPases in response to NaCl and ABA. *Journal of Plant Physiology* 164, 295–302.
- Jaworski, E. G. (1971) Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical* and *Biophysical Research Communications*, 43:1274-1279.
- Jiang, M., Zhang, J. (2001) Effect of abscisic acido n active oxygen species antioxidantive defence system and antioxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 42:1265-1273.
- Jia, W., Wang, Y., Zhang, S., Zhang, J. (2002) Sat-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in root than in shoots. *Journal of Experimental Botany*, 53:2201-2206.
- Kluge, C., Lamkemeyer, P., Tavakoli, N., Golldack, D., Kandlbinder, A., Dietz, K.J. (2003) cDNA cloning of 12 subunits of the V-type ATPase from *Mesembryanthemum crystallinum* and their expression under stress. *Molecular Memb Biol*, 20:171-183.
- Koshiba, T., Matsuyama, H. (1993) An in vitro system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. *Plant Physiology*, 102:1319–1324
- Kozlowski, T.T., Pallardy, S.G. (2002) Acclimation and responses of woody plants to environmental stresses. *Botanical Review*, 68:270-334.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991) Chorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42:313-349.
- Kumar, D., Klessing, D.F (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact*, 13:347-351.
- Lamotte, O.; Courtois, C.; Dobrowolsk, A.; Besson, A. P; Wendehenne. (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca⁺² concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 1369-1376.

- Lanteri, M.L., Pagnussat, G.C., Lamattina. L. (2006) Calcium and calciumdependent protien kinases are involved in nitric oxide-and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Jounal of Experimental Botany*, 57:1341-1351.
- Muller, P., Li,X.P., Niyogi, K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125:1558-1566.
- Munns, R., Husain, S., Rivelli, A.R., James, R.A, Condon, A.G.T, Lindsay, M.P, Lagudah, E.S, Schachtman, D.P, Hare, R.A. (2002) Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant Soil*, 247: 93-105.
- Nakamura, Y., Kasamo, K., Shimosato, N., Sakata, M., Ohta, E. (1992) Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca⁺ ions. *Plant Cell Physiol*, 33:139-149.
- Neill, S.J., Barros, R., Brigth, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., Wilson, I. (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress, *Journal of Experimental Botany*, 59:165-176.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T. (2002) Nitric oxide is a novel compound of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, 128:13-16.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T (2003) Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist*, 159:11-35.
- Omarov, R.T, Akaba, S., Koshiba, T., Lips, S.H. (1998) Regulation of aldehyde oxidase and nitrate reductase in roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) by nitrogen source and salinity. *Journal of Experimental Botany*, 49:897-902.
- Pagnussat, G.C; Lanteri, M.L; Lamattina, L. (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in acetic acid induced adventitious rotting process. *Plant Physiology*, 132:1241-1248.
- Pagnussat, G.C.; Lanteri, M.L.; Lombardo, M.C.; Lamattina, L. (2004) Nitric oxide mediates the indole acid induction of a mitogen-actived protein kinase cascade involved in adventious root development. *Plant Physiology*, 135: 279-286.
- Ralph, P.J., Gademann, R. (2005) Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany*, 82:222-237.
- Ratajczak, R. (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H(⁺)translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica acta*, 1465: 17-36
- Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum* 71:131-134.

- Rockel, P.; Kaiser, W.M. (2002) NO production in plants: nitrate reductase versus nitric oxide synthase. *Progress in Botany*, 63: 246-257.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., Kaiser, W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 53: 103–110.
- Sanakis, Y., Goussias, C., Mason, R.P., Petrouleas, V. (1997) NO interacts with the tyrosine radical Yd of photosystem II to form an iminoxyl radical. *Biochemistry*, 36:1411-1417.
- Sekmen, A.H.; Turkan, I.; Takio, S. (2007) Differential responses of antioxidative and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritime* and saltsensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum*, 131:399-411
- Serrano, R., Rodriguez-Navarro, A. (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current opinion in cell biology*, 13: 399-404
- Shunichi, T., Yamasaki, H. (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplast by nitric oxide. *FEBS Letters*, 512:145-148
- Song, L., Ding, W., Zhao, M., Sun, B., Zhang, L. (2006) Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Science*, 171:449-458.
- Spollen, W.G., LeNobre, M.E., Samuels, T.D., Bernstein, N., Sharp, R.E. (2000) Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*, 122: 967-976.
- Stöhr, C., Stremlau, S. (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 57: 463-470.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R., Rockel, P. (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212:835-841.
- Stöhr, C, Ullrich, WR. (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2293-2303.
- Takahashi, S., Yamasaki, H. (2002) Reversible inhibition of photophorylation in chloroplast by nitric oxide. *FEBS Letters*, 512: 145-148.
- Wilson, I.D., Neill, S.J., Hancock, J.T. (2008) Nitric oxide synthesis and signaling in plants. *Plant, Cell and Environment*, 31: 622–631.
- Wodala, B., Deák, Z., Vass, I., Erdei, L., Altorjay, I., Horváth, F. (2008) In vivo target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves. *Plant Physiology*, 146:1920-1927.

- Yamasaki, H., Sakihama, Y.; Takahashi, S. (1999) Na alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science*, 4:128-129.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y., Sakihama, Y. (2002) Inhibition effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide*, 5: 261-270.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, S., Tan, M. (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist*, 175:36-50.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Tan, M., Hu, X. (2006) Mitogen-actived protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology*, 141:475-487.
- Zhang, J., Kirkham, M.B. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology*, 35:785-791.
- Zhang, Y., Wang, L., LIU, Y., Zhang, Q., Wei, Q., Zhang, W. (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na/H antiport in the tonoplasto. *Planta*, 224: 545-555.
- Zhao, G.Q., Ma, B.L., Ren, C.Z. (2007) Growth, Gas exchange, Chlorophyll Fluorescence, and Ion content of Naked Oat in response to salinity. *Crop Science*, 47:123-131.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y., Li, B., Zhang, L. (2004) Nitric Oxide Function as a Signal in Salt Resistence in the Calluses from Two Ecotypes of Reed. *Plant Physi*ology, 134:849-857.
- Zorb, C., Noll, A., Karl, S. Leib, K., Yan, F., Schubert, S. (2005) Molecular characterization of Na⁺/H⁺ antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays*) and their expression under salt stress. *Journal of Plant Physiol*, 162: 55-66.



Figura 1 – Comprimento de raiz principal obtido em plantas de milho. Controle; 150 mM de NaCl; 200 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 200 μ M SNP+200 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+200 μ M de SNP; 150 mM de NaCl+ 200 μ M de SNP+ 200 μ M de PTIO; 300 μ M de tungstato (inibidor da enzima redutase do nitrato) e 200 μ M de PTIO. Colunas marcadas com um (*, *P*<0,05) asterisco indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.



Figura 2 – Número de raízes laterais emitidas. Controle, 150 mM de NaCl; 200 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+ 200 μ M de SNP; 150 mM de NaCl+ 200 μ M de SNP+ 200 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico). Colunas marcadas com um asterisco (*, *P*<0,05) indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.



Figura 3 – Massa fresca de plantas de milho. (A)- Raiz; (B)-Parte Aérea. Controle; 150 mM de NaCI; 200 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 200 μ M de SNP+ 200 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 150 mM de NaCI+ 200 μ M de SNP; 300 μ M de tungstato (inibidor da enzima redutase do nitrato). Colunas marcadas com um asterisco (*, *P*<0,05) indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.



Figura 4- Massa seca de plantas de milho. (A)- Raiz; (B)-Parte Aérea. Controle, 150 mM de NaCI; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 μ M de SNP+ 150 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 150 mM de NaCI+150 μ M de SNP; 300 μ M de tungstato (inibidor da enzima redutase do nitrato). Colunas marcadas com um asterisco (*, *P*<0,05) indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.



Figura 5 – Conteúdo de MDA em raízes de milho. Controle, 150 mM de NaCI; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 mM de NaCI+150 μ M de SNP; 150 mM de NaCI+ 150 μ M de SNP+150 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico). Colunas marcadas com um asterisco (*, *P*<0,05) indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.



Figura 6 – Atividade de enzimas antioxidantes em raízes de milho. (A)- Enzima Catalase (CAT); (B)- Enzima Guaiacol Peroxidase (GPX); (C)- Enzima Ascorbato Peroxidase (APX). Controle, 150 mM de NaCl; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 μ M de SNP+ 150 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+150 μ M de SNP. Colunas marcadas com um asterisco (*, *P*<0,05) indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.



Figura 7- Fluorescência da clorofila *a* (A) taxa relativa de transporte de elétrons (TRTE); (B) eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm) e Fv'/Fm'; Controle, 150 mM de NaCl; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 μ M de SNP+ 150 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+150 μ M de SNP. Colunas marcadas com um asterisco (*, *P*<0,05) indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.



Figura 8 – Fluorescência da clorofila *a*.em plantas de milho (A) "quenching" fotoquímico (qP) (B) "quenching" não-fotoquímico (NPQ) ; Controle, 150 mM de NaCl; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 μ M de SNP+ 150 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+150 μ M de SNP. Colunas marcadas com um asterisco (*, *P*<0,05) indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.



Figura 9 – Atividade da enzima redutase do nitrato (RN) em plantas de milho. (A)-Raízes; (B)- Folhas. Controle, 150 mM de NaCl; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 μ M de SNP+ 150 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+150 μ M de SNP; 300 μ M de tungstato (inibidor da enzima redutase do nitrato). Colunas marcadas com um asterisco (*, *P*<0,05) indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.

.


Figura 10 – Atividade hidrolítica e de transporte de prótons. A e B - Atividade de P-ATPase; C e D- V-ATPase; E e F – PPase. Controle, 150 mM de NaCl; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 μ M de SNP+ 150 μ M de PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+150 μ M de SNP. Colunas marcadas com um asterisco (*, *P*<0,05) indicam a diferença significativa pelo teste de Dunnett.







Figura 12- Modelo esquemático da participação do óxido nítrico como sinalizador durante o estresse salino

PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E INTERAÇÃO COM ÁCIDO ABSCÍSICO NA MODULAÇÃO DE BOMBAS DE PRÓTONS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE O ESTRESSE SALINO

Mirella Pupo Santos¹, Daniel Basílio Zandonadi², Arnoldo Rocha Façanha², Ricardo Bressan-Smith¹

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal - LMGV, Setor de Fisiologia Vegetal. ²UENF-, Centro de Biociências e Biotecnologia- CBB, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual. Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28013-620, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

Palavras-chave: Ácido abscisico; mutante sitiens, óxido nítrico, ATPases

Resumo

A relação entre o ABA e o gás óxido nítrico (ON) tem sido mostrada durante a resposta vegetal a diferentes estresses abióticos, incluindo a salinidade. No presente trabalho buscou-se a participação do ON na rota de sinalização promovida por ABA e a possibilidade da uma rota independente de ABA na mediação de respostas ao estresse salino. Foi possível observar que o ABA é necessário na indução de enzima antioxidante em plantas controle (*wt*) e que durante o estresse salino, possivelmente o ON atue como sinalizador após (*downstream*) o ABA ou que participe possivelmente de uma via independente

deste fitormônio. A atividade de bombas de prótons foi estimulada pelo NaCI e pelo SNP, havendo um efeito sinérgico quando aplicados em conjunto em plantas não mutante (*wt*) e *sitiens*. Além da ativação pós-traducional da ATPase do tipo P, foi observado um aumento de três vezes no nível de RNAm (LHA4) dessa enzima nas raízes do tomateiro *sitiens* em comparação ao *wt* pela análise de RT-qPCR em tempo real. LHA4 aumentou em quatro vezes devido ao ON em plantas *wt* e apenas 25 % em plantas *sitiens*. O NaCI aumentou a expressão relativa de LHA4 em plantas *wt* em cerca de 50 %, mas reduziu em cerca de 3 vezes em plantas *sitiens*. O estresse salino induz à produção de ON em raízes do genótipo *wt*, entretanto reduziu nas plantas mutantes. Esta produção parece ser dependente de enzimas produtoras de ON, como a redutase do nitrato. O balanço da ativação entre as bombas de H⁺ associado à síntese de ON e indução de enzimas antioxidantes pode compor um dos mecanismos de controle de resposta ao estresse salino em plantas.

Abstract

Nitric oxide production and interaction with ABA in proton pumps regulation and antioxidant enzymes stimulation during salt stress

The relationship between abscisic acid (ABA) and the gas nitric oxide (NO) has been shown during the plant response to the different abiotic stresses, including salinity. This study was carried out to verify the NO role in the ABA signalling pathway and the possibility of an independent ABA route in mediating responses to salt stress. It was shown that ABA is required to antioxidant enzymes' activation in wild type (*wt*) plants during salt stress and that NO possibly act as a signal downstream ABA pathway or even using an ABA-independent pathway. The proton pump activity was stimulated by NaCl and NO donor (SNP), and there was a synergistic effect when applied combined in *wt* and mutant plants defective in ABA production (*sitiens*). Besides the P-type ATPase post-translational activation, it was observed an increase in the mRNA level of LH4 isoform of this enzyme in roots of tomato *sitiens* compared with *wt*, using real time RT-qPCR. SNP increased 4-fold the LHA4 transcripts in *wt* plants and only 25 % in *sitiens* plants. NaCl increased around 50 % the relative expression of LHA4 in *wt* plants and suppressed the expression of this isoform in mutant plants (around 3-fold). The

NO production was induced by the salt stress in the *wt* genotype roots, however there was a reduction in mutant plants. This production seems to be dependent of NO enzymes producers such as the nitrate reductase. The concerted H⁺ pumps activation associated to the NO production and antioxidant enzymes activity can be part of a response control mechanism to salt stress in plants.

Key Word: abscisic acid, nitric oxide, proton pump, antioxidant, salt stress

Introdução

O fitormônio ácido abscísico (ABA) está relacionado à regulação de respostas adaptativas das plantas a estresses ambientais, como o fechamento estomático, a produção de prolina (Chaves et al., 2008; Bartels e Sunkar, 2005) e o desenvolvimento radicular (Deak e Malamy, 2005). Participa ainda de muitas vias de crescimento e desenvolvimento, incluindo síntese de proteínas em sementes, dormência e a promoção da tolerância à dessecação de sementes (Chaves et al., 2008; Bartels e Sunkar, 2005).

As plantas sob estresse hídrico ou salino apresentam incrementos do conteúdo de ABA, principalmente na parte radicular (Jia et al., 2002). Além do acúmulo de ABA durante o estresse, há a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e moléculas associadas a defesa contra estes radicais (Sminorff, 1993; Jiang e Zhang, 2001; Jiang e Zhang, 2002).

Tem sido documentado que o ABA causa o acréscimo de superóxido (O_2) (Jing e Zhang, 2002) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Jiang e Zhang, 2001; Jiang e Zhang, 2002) e que possui envolvimento na indução da atividade e da expressão gênica de enzimas antioxidantes como, a superóxido desmutase (SOD) (Zhu e Scandalios, 1994; Guan e Scandalios, 2000) e a catalase (CAT) (Jiang e Zhang, 2001).

O estudo da participação do hormônio ABA em rotas de sinalização vegetal pode ser realizado com mutantes hormonais. Existem vários mutantes deficientes na produção de ABA (Taylor et al., 2000), entre estes há o mutante *sitiens*, que possui mutação no gene responsável pela produção da última enzima da rota de produção de ABA, a ABA aldeído oxidase (AAO). Estas plantas possuem germinação precoce havendo viviparidade, ou seja, germinação de sementes

dentro do fruto. Possuem baixa condutância hidráulica (Nagel et al., 1994; Holbrook et al., 2002), desenvolvimento vegetal mais lento, com menor massa de parte aérea seca e alongamento radicular reduzido, sendo esta última característica atribuída ao aumento dos níveis de etileno nestas plantas (Groot e Karssen, 1992; Ni e Bradford, 1993; Spollen et al., 2000; Aroca et al., 2008). Possui sensibilidade ao estresse salino (Makela et al., 2003), entretanto, é considerado resistente a *Botrytis cinerea* (Asselbergh et al., 2007).

O óxido nítrico (ON) é um gás lipofílico, de tamanho reduzido e moderada solubilidade em água. Reage rapidamente com moléculas que tenham elétrons desemparelhados (Neill et al., 2008). Foi relatado que o ON participa da modulação de sinais de transdução em vias metabólicas afetando os níveis de mensageiros secundários como o GMPc, ADPRc e Ca⁺² (Durner et al., 1998; Pagnussat et al., 2003; Pagnussat et al., 2004).

Uma das vias de síntese de ON nas plantas é feita pela redutase do nitrato (RN), por meio da redução de nitrito para ON usando NADPH como doador de elétrons (Desikan et al., 2002; Stöhr et al., 2001, Stöhr e Stremiau, 2006). A AtNOA1 é uma enzima produtora de ON recentemente descoberta em *Arabidopsis* (Guo et al., 2003; Crawford et al., 2006). O ON pode também ser produzido por reações não enzimáticas, como a redução de nitrito no apoplasto por acidificação do pH em resposta à giberelina e ao ABA ou, por meio de reação química na presença de carotenóides e luz (Bethke et al., 2004; Stöhr e Ullrich, 2002).

A molécula de ON tem se revelado capaz de influenciar vários processos em vegetais tais como: crescimento de raízes (Gouvêa et al., 1997), germinação de sementes (Belini e Lamattina, 2000), fotomorfogênese (Pagnussat et al., 2003), lignificação de parede celular (Ferrer e Ros Barceló, 1999), senescência (Magalhães et al., 2000), movimento de estômatos (Neill et al., 2002; Garcia-Mata e Lamattina, 2002), aumento da disponibilidade de ferro (Graziano et al., 2002; Murgia et al., 2002), funcionalidade mitocondrial (Zottini et al., 2002) e de cloroplastos (Takahashi e Yamasaki, 2002), defesa contra patógenos (Delledonne et al., 1998; Delledonne et al., 2001) e sinalização celular durante o estresse hídrico, salino e de calor (Zhang et al., 2006; Song et al., 2006).

O ON é relatado como mediador de respostas hormonais em particular mediando efeitos de hormônios e moléculas envolvidas em estresses abióticos.

Recentemente, o ON foi relatado como indutor de tolerância ao déficit hídrico, por atuar como mensageiro secundário de ABA durante o fechamento estomático, (Garcia-Mata e Lamattina, 2003), aumentar a síntese de proteínas Lea e induzir enzimas antioxidantes (Lamotte et al., 2004; Lamote et al., 2006; Zhang et al., 2007) e aumentar a atividade de bombas de prótons (Zhao et al., 2004; Zhang et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi estudar a interação entre o hormônio ABA e o ON em processos fisiológicos durante o estresse salino, utilizando para tal o mutante na produção de ABA, *sitiens*. Para essa finalidade, o presente trabalho pretende responder algumas questões: O estresse salino induz ou não a produção de ON nos dois genótipos? A atividade de enzimas antioxidantes é estimulada pelo ON? Este estímulo é dependente da presença de ABA? A produção de ON é dependente da atividade da enzima RN e de ABA? O ON modula a atividade de ATPases e PPase e a expressão de P-ATPase? Esta modulação ocorre em plantas silvestres e no mutante *sitiens*?

Material e Métodos

Material vegetal

Foram utilizadas sementes de plantas não mutantes (wt) e *sitiens* (st) de tomateiro (*Solanum lycopersicum* var. Alicia Craig), provenientes do Departamento de Ciências Horticulturais do Instituto de Genômica de Plantas e Biotecnologia da Universidade Texas A&M, adquiridas por intermédio da Professora Marla L. Binzel.

As sementes germinadas em vasos contendo vermiculita foram mantidas em sala de germinação durante 1 semana. Após este período as plantas foram transferidas para casa de vegetação e mantidas por 5 dias em aclimatação. As plantas foram transferidas para meio hidropônico (solução de Hoagland 1/5 da força). A cada semana foi realizada a reposição dos nutrientes e aumentada a força da solução de Hoagland até obter força 1. Estas plantas foram mantidas nestas condições por 1 mês e depois utilizadas nos experimentos.

Tratamentos realizados

Plantas de tomate (wt) e *sitiens*, quatro dias após a germinação, foram tratadas com doses crescentes de NaCl (50, 150 e 200 mM), com o doador de ON o SNP (nitroprussiato de sódio) e PTIO (seqüestrador de ON) nas concentrações variadas (50, 150 e 200 mM) durante três dias para determinação da dose adequada a ser utilizada dos experimentos posteriores. Estas doses foram determinadas com base no crescimento radicular e da parte aérea, bem como com base nas doses mais utilizadas na literatura.

Após este experimento prévio, plantas de tomateiro wt e *sitiens*, cultivadas sob as mesmas condições descritas anteriormente, foram tratadas com: (1) 150 mM de NaCl; (2) 150 μ M de SNP (doador de ON); (3) 150 mM de NaCl + 150 μ M de SNP; (4) 200 μ M SNP + 200 μ M de PTIO (seqüestrador de ON); (5) 200 μ M de L-Name (inibidor da síntese de ON pela NOA1); (6) 300 mM de tungstato de sódio (Na₂WO₄), (inibidor da enzima redutase do nitrato e da síntese de ABA) e; (7) 150 mM de NaCl+ 300 mM tungstato. Após 24 h foram analisadas as seguintes características: atividade da redutase do nitrato (RN), atividade das enzimas antioxidantes (catalase, guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase), atividade das bombas de H⁺ (ATPase tipo P, tipo V e V-PPase) e detecção de óxido nítrico.

Os mesmos tratamentos foram realizados para o experimento de maior duração (7 dias). Neste foram realizadas as seguintes análises: teores de clorofilas e de pigmentos carotenóides, peroxidação lipídica e integridade de membrana.

Fotossíntese e trocas gasosas

A taxa fotossintética líquida (An, μ mol m⁻² s⁻¹), a condutância estomática (*g*s, mol m⁻² s⁻¹), a transpiração (E_a mmol⁻² s⁻¹) e o déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (DPV_{folha-ar} kPa) foram determinados usando o analisador de gases no infravermelho (IRGA), acoplado a um sistema portátil de medição das trocas gasosas, modelo LI-6200 (LI-COR, USA).

Comparação anatômica das folhas de wt e sitiens

Fixação e Desidratação de material botânico

Foram retiradas três folhas de cada um dos 10 indivíduos silvestres (wt) e s*itiens* em um total de 30 folhas. Fragmentos do terço médio da lâmina foliar foram fixados em campo em uma solução de glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 4,0 % e tampão cacodilato 0,05 M em pH 7,2, lavados neste mesmo tampão cacodilato e pós-fixados em uma solução de tetróxido de ósmio 1 % e tampão cacodilato 0,05 M, à temperatura ambiente. Após nova lavagem em tampão cacodilato 0,05 M, os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de acetona (50 %, 70 %, 90 % e 3 vezes 100 %).

Microscopia óptica

Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à etapa de infiltração onde a acetona foi substituída gradualmente pela resina epóxi (Epon 812). As amostras em resina pura foram colocadas em formas e levadas à estufa a 65 °C por 48 h para a polimerização e obtenção de blocos. Com um ultramicrótomo (Reicheit Ultracut S) foram retirados cortes semifinos de 0,70 µm de espessura com o auxilio de faca de vidro, no sentido transversal. As secções foram coradas com azul de toluidina 1 %, por 1 minuto. As lâminas foram seladas com Entelan® e observadas em microscopia de campo claro (Axioplan ZEISS).

Caractreísticas quantitativas

A espessura da lâmina, mesofilo, parênquima paliçádico e parênquima lacunoso foi calculada a partir de secções transversais do terço médio da lâmina foliar. As imagens obtidas foram processadas e analisadas utilizando sistema digital de processamento de imagens Analysis SIS LINK/Oxford – Zeiss. Foram examinados 25 campos para cada indivíduo, calculando-se a média aritmética e o desvio padrão dos resultados obtidos.

A significância das diferenças entre os parâmetros anatômicos quantitativos mensurados foi determinada por teste t. Folhas totalmente expandidas nas raízes foram coletadas, lavadas em água deionizada e secas cuidadosamente em papel absorvente. Amostras de 0,3 g, sem as nervuras centrais foram congeladas em nitrogênio líquido (N₂ líquido) e imediatamente armazenadas em freezer -70 °C para posterior análise de carboidratos solúveis.

As amostras de tecido foliar foram maceradas em N₂ líquido até a obtenção de um pó fino, contendo polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 10 % (p/v), ácido ascórbico 50 mM, com posterior adição de 1 mL de etanol (ETOH) 80 %. Após serem vortexados, os microtubos foram selados e levados a banho-maria a 70 °C por 90 minutos. Depois de retirados do banho, os microtubos foram centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados em frascos previamente identificados e os pellets ressuspendidos em 1 mL de ETOH 80 % centrifugados nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes resultantes foram adicionados aos provenientes da primeira centrifugação e armazenados a -20 °C para posteriores quantificações de glicose, frutose e sacarose. Os pellets foram novamente ressuspendidos em 1 mL de ETOH 80 %, centrifugados nas mesmas condições anteriores, com posterior descarte do sobrenadante.

Os teores de glicose, frutose, sacarose foram quantificados conforme metodologia descrita por Sttit (1989), onde reações acopladas enzimaticamente reduzem o NAD⁺, o qual é determinado em leitor de microplacas a 340 nm. Para tanto, 10 mL do extrato foi adicionado a 133 mL de tampão A (Imidazole 100mM, MgCl₂ 5 mM, NAD⁺ 2 mM, ATP 1 mM, dlicose-6-fosfato desidrogenase 2U mL⁻¹ pH 7.4) e 102 mL de H₂O ultrapura. Para a determinação de glicose, adicionou-se 5 mL do preparado da enzima hexoquinase (EC 2.7.1.1) a 1,5 U realizando-se leituras a cada 10 minutos até que os valores estabilizaram-se. Para a determinação de enzima fosglicose isomerase (EC 5.3.1.9) a 3 U realizando-se leituras a cada 10 minutos até que os valores estabilizaram-se 5 mL do preparado da enzima invertase (EC 3.2.1.26) a 5 U realizando-se leituras a cada 10 minutos até que os valores estabilizaram-se estabilizaram-se.

Determinação do conteúdo de clorofila a e b e carotenóides totais

Foi pesado 100 mg de tecido fresco e foram colocados em tubos de ensaio, contendo 5 mL de dimetilsulfoxido (DMSO), protegidos da luz com papel alumínio, ficando no escuro por 72 h como proposto por Hiscox e Israelstam (1979). Após a extração com o DMSO, foi retirada uma alíquota para leitura nos comprimentos de onda de 649 e 665 nm e 710 nm no leitor de placas. Os teores de clorofila total a, b e carotenóides foram determinados a partir das equações: Clorofila _a = $12.47A_{665} - 3.62A_{649}$; Clorofila _b = $25.06A_{649} - 6.5A_{665}$; Carotenóides = $(1000A_{480} - 1.29C_a - 53.78C_b)/220$, e expressos em µg/mL, segundo Wellburn (1994).

Fluorescência da clorofila a

A cinética da emissão da fluorescência da clorofila *a* foi medida na terceira folha (contando do ápice para a base da planta) completamente expandida, utilizando-se um fluorímetro modulado Mini-Pam (Walz, Alemanha). As variáveis foram obtidas seguindo-se uma curva de resposta à luz, a qual tinha oito períodos consecutivos de iluminação com intensidade crescente, resultando nos seguintes parâmetros: eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm), o "quenching" fotoquímico (qP) e o "quenching" não-fotoquímico (qN) e a taxa relativa de transporte de elétrons (TRTE).

Determinação da peroxidação lipídica

A estimativa da peroxidação de lipídios das membranas de raízes e folhas foi feita pela medida do conteúdo de malondialdeído (MDA), de acordo com Dhindsa, et al (1981). Foram retiradas 5 gramas de tecido fresco e maceradas em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % na presença de polivinil polipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por dez minutos. Um mililitro do sobrenadante foi retirado e adicionado a 4 mL de uma mistura formada por TCA 20 % e TBA 0,5 % (ácido tiobarbitúrico). O extrato foi submetido a 95 ^oC por 30 minutos, seguindo-se de rápido resfriamento em gelo. A amostra foi lida a 535 e 600 nm. A concentração de MDA foi determinada utilizando o coeficiente de extinção de 155 mM. cm⁻¹) e expressa em nmol.mg⁻¹ de tecido fresco.

Determinação da integridade de membrana

A determinação de integridade de membrana (PIR) das células foi realizada de acordo com Vasquez-Tello et al. (1990), com modificações. Dez discos de 1 cm de diâmetro (100mg de cada tecido), foram lavados três vezes em água ultrapura e colocados imersos em 10 mL de água ultrapura em um tubo de ensaio durante 24 h, à temperatura de 8 °C. As leituras de condutividade (condutividade livre – CL) foram realizadas no condutivímetro *Quimis, modelo Q-405 A2*. Os tubos após a primeira leitura foram submetidos à temperatura de 80 °C, por 30 minutos em banho-maria e colocados a 8 °C por 24 horas. Após esse período, foi determinada novamente a condutividade (condutividade total – CT). A porcentagem de integridade de membrana (PIM) foi calculada pela fórmula, PIM = $[1-(CL/CT)] \times 100$.

Determinação da atividade da redutase do nitrato

Utilizou-se o método *in vivo*, descrito por Jaworski (1971) para determinação da atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de milho. Para tal, foram retirados discos foliares de 0,5 cm de diâmetro ou fragmentos de raízes e pesados para obtenção de, aproximadamente, 200 mg de tecido fresco. Os discos foliares ou os fragmentos de raízes foram colocados em meio de incubação, composto por tampão fosfato pH 7,5, KNO₃, propanol e triton e submetidos ao vácuo por 3 minutos. As amostras foram levadas para o banhomaria a 30°C por 40 minutos com agitação constante em total obscuridade (envolto com papel alumínio). A atividade da enzima foi estimada pela quantidade de NO_2^- liberada na solução de incubação, medida em espectrofotômetro, a 540 nm, e expressa em µmoles de NO_2^- .h⁻¹. g⁻¹ de matéria fresca.

Atividade de enzimas antioxidantes

Preparação de extrato enzimático

Após cada tratamento, um grama de raízes foi macerado em nitrogênio líquido em gral de porcelana na presença de PVPP, na proporção de 5 % (p/v) para a concentração final de tampão a ser utilizado. Após a obtenção de um pó fino, foi acrescentado tampão na proporção de 1:4 (p/v). O tampão de extração era composto por 100 mM de fosfato de potássio, 1 mM de EDTA e 3 mM de DTT com pH ajustado para 7,5. O homogenato foi centrifugado a 15.000 g por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante coletado foi distribuído em tubos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C. A determinação do conteúdo de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Jiang e Zhang, (2001), com algumas modificações. O ensaios foram realizados utilizando o tampão fosfato 50 mM com pH 7,0 e concentração final de H_2O_2 de 15 mM. A reação foi iniciada com adição de 15 µL do extrato enzimático e as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro, monitorando a decomposição de H_2O_2 a 240 nm (ϵ = 36mM. cm⁻¹) durante 1 min, após o início da reação. O branco foi composto de meio de reação livre de H_2O_2 . A atividade da CAT foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Determinação da atividade da guaiacol peroxidase (GPX)

A atividade da GPX foi determinada por mensuração da taxa de oxidação de guaiacol a tetraguaicol por monitoramento do acréscimo, na absorvância a 470 nm (ϵ = 26,6 mM. cm⁻¹), de acordo com o método usado por Zhang e Kirkham (1994), com algumas modificações. O meio de reação foi composto de 5 mM de guaiacol, 1,2 mM de H₂O₂ em 50 mM tampão fosfato de sódio pH 6,0. A reação foi iniciada com adição de 10 µL de extrato enzimático. Foi utilizado como branco o meio de reação livre de extrato enzimático. A atividade da GPX foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada de acordo com Jiang e Zhang, (2001). Para isso, o meio de reação foi preparado com, 0,5 mM de ácido ascórbico, 1 mM de EDTA, 1 mM de H₂O₂ em 50mM tampão fosfato de potássio pH 7,0. A reação foi iniciada com a adição de 30 μ L do extrato enzimático e as leituras de decréscimo de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 290 nm (ϵ = 2,8 mM cm⁻¹), monitorando a oxidação de ascorbato, tendo, como branco, o meio de reação livre de H₂O₂ e extrato enzimático. A atividade da APX foi expressa em μ mol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Determinação da atividade das bombas de H⁺

Preparação da fração microssomal

As frações microssomais contendo vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto foram isoladas do material vegetal, através de centrifugação diferencial, essencialmente como descrito por Giannini e Briskin (1987).

Após pesado, o material vegetal (2 g) foi homogeneizado em meio tamponado em gral de porcelana, onde o volume de tampão utilizado foi 1,5X a quantidade de material fresco. A maceração foi processada no gelo. O tampão de extração é constituído de sacarose 250 mM, glicerol 10 %, Mops-BTP 100 mM, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 0,4 % de PVP-40T, 0,3 % BSA, 100 mM de KCI. (pH 8,0). O homogenato foi filtrado em membrana *Miracloth* (Calbiochem). O extrato foi centrifugado a 3000 x g por 10 minutos a 4 °C para a remoção das células não rompidas e impurezas. O sobrenadante foi centrifugado em ultracentrífuga a 10.000 x g por 10 minutos a 2 °C para separação das mitocôndrias (precipitado). O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 100.000 g por 40 minutos a 2 °C para obtenção da fração microssomal (membrana de vacúolo e membrana plasmática). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em meio de ressuspensão (volume de 500µL). O meio de ressuspensão foi constituído contendo glicerol 15 %, tris-HCl 20 mM (pH 7,6), 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT e PMSF 1 mM. Este material foi armazenado a -70 °C em diferentes alíquotas.

As atividades ATPasicas foram determinadas colorimetricamente, consistindo na determinação de Pi liberado durante a hidrólise do ATP, segundo o método descrito por Fiske e Subbarrow (1925), com modificações propostas por Façanha e De Meis (1998). As reações foram iniciadas com a adição da proteína e finalizadas através da adição de 5 % (m:v) de ácido tricloroacético gelado. O meio de reação composto foi composto de 50 mM de Tris-BTP (pH 7,0), 100 mM de KCI, 5 mM de MgSO₄, 0,2 mM de Na₂MoO₄, 0,2 mM de Na₂VO₄⁻ e 1 mM de ATP. Ao meio de reação foi adicionado 30 µg de proteína por mL. A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição da mistura contendo molibidato de Amônio 2 % em H₂SO₄ 2 % + Ácido Ascórbico 1 % (100:1). Após 5-10 minutos, realizou-se a leitura em leitor de microplaca Modelo μ Quant, Bio Tek instruments, *NC*, em comprimento de onda de 750 nm.

Transporte de H⁺

O gradiente de prótons foi medido monitorando a taxa de decréscimo da fluorescência (DF) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro (modelo F 4500, HITACHI, Japan). O meio de reação foi composto de 10 mM Mops-BTP (pH 7.0), 100 mM KCI, 5 mM MgSO₄, 250 mM sacarose, 2 mM ACMA, 1 mM de ATP ou PPi e 30 µg de proteína/ml. Após atingir o equilíbrio entre efluxo e influxo de prótons, utilizou-se 20 µL de FCCP ou NH₄CI para dissipar o gradiente formado. A partir dos dados obtidos foi determinada a velocidade inicial (V₀) e a variação da fluorescência máxima (DF_{máx}).

Detecção de ON

As imagens para detecção de ON foram realizadas com a sonda 4,5diaminofluoreceina diacetato (DAF-2 DA) em microscópio ótico de fluorescência (Zeiss Axioplan com câmera digital Canon A640 acoplada). Raízes de plântulas de tomate com 5 dias de idade tratadas por 72h foram mantidas em tampão 10 mM de Hepes-BTP pH 7,5 com 10 µM da sonda DAF-2 DA por 40 minutos. As amostras foram lavadas 3 vezes com o tampão Hepes-BTP e analisadas em seguida no microscópio (excitação: 488 nm, emissão: 495-575 nm). As imagens foram analisadas pelo programa ImageJ[™]. Raízes sem adição DAF-2 DA foram utilizadas como controle negativo. As características de obtenção de imagens pela câmera foram mantidas idênticas durante a aquisição de todas as imagens e não sofreram nenhum tipo de processamento ou tratamento. Pelo menos 5 amostras foram analisadas em 4 experimentos independentes.

Expressão relativa de RNAm

Extração de RNA total

Foram macerados 100-200 mg de tecido radicular fresco com auxílio de almofariz e pistilo, na presença de N₂ líquido. O macerado foi transferido para tubos de microcentrífuga (1,5 mL) novos e livres de RNAse. Ao material foi adicionado 1 mL do reagente TRIZOL (Life Technologies). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 8 °C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Foi adicionado a este 500 mL de clorofórmio, sendo o tudo levado à agitação por 2 min à temperatura ambiente. Logo após, foi realizada outra centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 8 °C, sendo o sobrenadante transferindo para outro tubo, ao qual foi adicionado 500 mL de isopropanol. O material foi misturado por inversão e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 12000 g, 10 min e 8 °C, descartando-se, em seguida, o sobrenadante e adicionando-se sobre o sedimento resultante 1 mL de etanol 75 % e agitado. A amostra foi novamente centrifugada, 7500 g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi seco a 37 °C por aproximadamente 10 minutos, sendo posteriormente ressuspenso com 50 mL de água-DEPC. Uma alíquota (1 mL) de cada amostra de RNA total foi submetida à eletroforese em gel de agarose-DEPC 1 % para quantificação, fotodocumentação e confirmação da qualidade. O material restante foi armazenado em freezer -70 °C até o momento de uso posterior.

Transcrição Reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizados 1-2 µg de RNA total para produção de cDNAs. A síntese foi realizada com o kit *High capacity cDNA Reverse transcription* (Applied Biosystems, USA). Uma PCR com gradiente de temperatura foi realizada a fim de confirmar a especificidade dos *primers* e a temperatura de *melting* real. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1.2 % com tampão TAE para a confirmação dos produtos de PCR com os *primers* específicos (Tabela 1).

O cDNA sintetizado descrito no item anterior foi utilizado como molde para as reações no termociclador Light Cycler 1.5 (Roche). Os componentes da reação foram preparados para a concentração final indicada: 2.4 μ L de MgCl₂ (4 μ M), 0,6 μ L do *primer* direto (0,6 μ M), 0,6 μ L do *primer* reverso (0,6 μ M), 2 μ L do componente *LightCycler* e 13 μ L de água ultrapura. Os 19 μ L do meio foram adicionados ao capilar o vidro e adicionado 1 μ L de cDNA.

As expressões relativas do RNA mensageiro (RNAm) dos genes de interesse LHA4 (*Lycopersicum esculetum* <u>H</u>⁺-<u>A</u>TPase isoforma <u>4</u> de membrana plasmática) e do controle endógeno TUB (TUBulina) (tabela 1) foram comparadas utilizando-se um teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso (*Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*®) como descrito por Pfaffl et al. (2001 e 2002).

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições por tratamento, ambos os experimentos, de 1 ou 7 dias, foram realizados três vezes. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para a avaliação de todas as características. Os experimentos comparativos entre plantas silvestres (wt) e *sitiens* foram analisados estatisticamente usando o teste t (P < 0,05). A diferença entre mais de dois tratamentos em relação foi determinada pelo teste de média DMS (P < 0,05). As análises foam realizadas no programa Sisvar (Ferreira, 1999).

 Tabela 1. Informações das seqüências de primers utilizados nos experimentos.

Definição da seqüência	Número de acesso GenBank	Tamanho produto (pb)	Nome do primer		Seqüência do primer
L. esculentum plasma P-ATPase (LHA4) gene, mRNA sequence	U72148	148	LHA4	Forward Reverse	5'-TGGATTGCTACCCCTCTTTG-3' 5'-TATTCCCATTCCAAGCCTAC-3'
S. lycopersicum cDNA clone Tubulin alpha chain, mRNA sequence	BG791276	99	TUB	Forward Reverse	5'-ACTGGAGCTGGAAAGCATGT-3' 5'-GTGAAAGAGCTGCCGGTAAG-3'

Resultados

A Fig.1 é uma foto ilustrativa na qual é possível observar as diferenças do fenótipo entre as plantas wt e mutantes.

A lâmina foliar do tomateiro apresenta-se anfiestomática e a superfície coberta por cutícula na superfície adaxial e abaxial (Fig. 2). Em secção transversal, ambos os genótipos exibem epiderme unisseriada com células de formato tabular, recobertas por uma cutícula delgada. Os estômatos em plano transversal revelam que suas células estomáticas se localizam ligeiramente acima do nível das demais células epidérmicas.

Em estudos anatômicos foi possível observar modificações anatômicas na planta mutante (*sitiens*) quando comparada à planta wt. Em corte transversal da lâmina foliar apresenta-se o mesofilo dorsiventral consistindo de parênquima fotossintetizante diferenciado em parênquima paliçádico e lacunoso. Nas plantas wt o parênquima paliçádico é formado por 2 a 3 estratos de células subjacentes à epiderme adaxial. Suas células estão dispostas perpendicularmente à superfície da lâmina foliar e apresentam poucos espaços intercelulares. Próximo à epiderme abaxial encontra-se o parênquima lacunoso, formado por 4 a 5 estratos de células com formas e disposição irregulares, gerando espaços celulares de dimensões variadas. Enquanto na planta mutante o parênquima paliçádico é formado por 1 a 2 estratos de células subjacentes à epiderme adaxial, dispostos não tão perpendicularmente à superfície da lâmina foliar e apresentam nuitos espaços intercelulares. O parênquima lacunoso é formado por 3 a 4 estratos de células com formas e disposição irregulares e, comparativamente à planta wt, apresenta menor compactação (Fig. 2).

A epiderme adaxial apresenta-se encurtada na planta mutante em 25 %, entretanto, não foi estatisticamante diferente da planta wt (Tabela 2). Já a epiderme abaxial apresenta-se estatisticamente menor que a planta wt. A espessura da lâmina foliar e do mesofilo encontrado no mutante é 36 % menor que o encontrado na planta wt. A espessura do parênquima paliçádico e esponjoso é cerca de 40 % e 35 % menos espesso, entretanto, a espessura do parênquima esponjoso não distinguiu estatisticamente da planta wt (Tabela 2).

Foi observado que a condutância estomática e a taxa de transpiração são maiores no mutante apresentando taxas de 63 % e 23 %, respectivamente,

maiores que no genótipo wt. A taxa de fotossíntese líquida encontrada no genótipo wt foi de 20 µmol. m⁻². s⁻¹ e no mutante de 16,9 µmol. m⁻².s⁻¹, não sendo diferentes estatisticamante. O déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (DPV) foi maior no *sitiens* apresentando valor 56 % maior que genótipo wt (Fig. 3).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila a Fv/Fm, qP, qN, NPQ e TRTE foram analisados em plantas wt e mutantes. Os resultados mostram que a razão Fv/Fm e Fv'/Fm' foi menor em plantas mutantes em todos os pontos da curva de luz (Fig. 4A). Os valores de NPQ e qN foram superiores em plantas *sitiens* em todos os pontos da curva de luz (Fig. 4B e 4D). As plantas mutantes apresentaram valores de qP menores que os encontrados em plantas wt (Fig. 4C).

As dosagens de açúcares solúveis em raízes mostraram que as concentrações destes foram maiores no *sitiens* (Fig. 5). A concentração de glicose no *sitiens* foi 74 % maior que no genótipo wt. As plantas mutantes também apresentaram aumento no teor de frutose e sacarose em 115 %, 50 %, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados nas folhas analisadas (Fig. 6). O *sitiens* apresentou as maiores taxas dos açúcares analisados, havendo incremento de 126 %, 82 % e 64 % em glicose, frutose e sacarose, respectivamente

A concentração de clorofila *a* não diferiu estatisticamente entre os genótipos (Fig. 7A). O genótipo wt apresentou pouca modificação no conteúdo de clorofila *a* quando tratado com NaCl, com redução não significativa de 5%. Entretanto, quando as plantas do genótipo mutante foram submetidas à salinidade houve redução significativa de 24 % desta característica. O doador de ON reduziu o efeito do sal mantendo o nível de clorofila *a* semelhante ao controle na planta *sitiens*. O tratamento NaCl+SNP+PTIO reduziu os teores de clorofila a em 27 % na planta mutante.

O mutante sitiens possui a concentração de clorofila *b* 5 % maior que o conteúdo encontrado nas plantas wt, entretanto, este acréscimo não é significativo. O tratamento salino reduziu de forma não significativa a concentração deste pigmento em ambos os genótipos. Os resultados com o tratamento com SNP ou NaCI+SNP+PTIO não deferiram do tratamento salino (Fig. 7C).

O teor de carotenóides encontrado no genótipo mutante é 40 % maior que no genótipo wt, entretanto, esta concentração não foi considerada estatisticamente diferente. As plantas wt praticamente não apresentaram modificações no conteúdo de carotenóides totais com o tratamento salino. Plantas mutantes tratadas com NaCl ou NaCl+SNP ou NaCl+SNP+PTIO apresentaram aumento não significativo dos teores de carotenóides quando comparado ao controle, já quando comparado com planta controle wt ou tratada com NaCl apresenta-se estatisticamente maior na planta mutante. O genótipo wt não apresentou variações nas concentrações de carotenóides com os tratamentos NaCl+SNP ou NaCl+SNP+PTIO (Fig. 7C).

Os níveis de malondialdeído (MDA) de raízes foram aumentados de forma não siginicativa no genótipo wt, já no genótipo mutante o tratamento salino apresentou acréscimo significativo de 60 %. O tratamento NaCl+SNP em plantas wt teve os níveis de MDA semelhantes ao controle, já nas plantas mutantes este tratamento reduziu os efeitos do NaCl mantendo os níveis de MDA semelhantes ao controle. O tratamento com NaCl+SNP+PTIO não alterou a concentração de MDA nas plantas wt mais aumentou significativamente nas mutantes (Fig. 8 A).

O tratamento salino aumentou os teores de MDA em folhas de plantas wt e no mutante em 29 % e 35 %, respectivamente. Entretanto, o aumento foi significativo somente nas plantas mutantes (Fig. 8 B). O ON reduziu os efeitos gerados pelo sal, onde a concentração de MDA foi semelhante ao controle em ambos os genótipos. O tratamento com NaCI+SNP+PTIO não diferiu no genótipo wt mas aumentou significativamente os níveis de MDA nas folhas das plantas mutantes.

A integridade da raiz na planta mutante é cerca de 10 % menor em comparação com a planta wt, entretanto, esta diferença não é significativa (Fig. 9 A). Quando as plantas foram submetidas ao tratamento salino não houve redução significativa da integridade da raiz da planta wt, mas isto ocorreu na planta mutante com redução de 21 %. O tratamento com SNP em conjunto com NaCl minimizou os efeitos da salinidade nas raízes, reduzindo pela metade a perda de integridade em plantas wt. Em plantas mutantes a perda de integridade reduziu para 13 % em relação ao controle.

A integridade de folhas nas plantas mutantes apresenta-se 20 % inferior às plantas wt, entretanto, esta diferença não foi significativa (Fig. 9 B). O tratamento

salino reduziu drasticamente a integridade na planta mutante, cerca de 70 %, não sendo alterada na planta wt. O tratamento com o doador de ON reduziu os efeitos do sal em plantas mutantes, com redução da perda de integridade. As plantas wt tratadas com NaCl+SNP+PTIO apresentaram valores semelhantes ao controle, já nas plantas mutantes houve redução significativa de 48 %.

As atividades de enzimas antioxidantes em plantas *sitiens* possuem a atividade superior à encontrada nas plantas wt. A enzima catalase (CAT) apresentou atividade 3 vezes maior em *sitiens* comparadas a wt (pelo teste t). O tratamento salino aumentou de forma significativa a atividade da enzima CAT das plantas wt, 73 %, entretanto, não alterou a atividade desta enzima nas plantas mutantes. O ON aumentou significativamente em 2,5 vezes a atividade de CAT em plantas wt, já nas plantas mutantes a indução foi de apenas 31 %. (Fig. 10 A e 10-B).

As plantas *sitiens* possuem a atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPX) quase 4 vezes superior à da planta wt (pelo teste t). O tratamento salino aumentou em 1,5 vezes a atividade de GPX em plantas wt, já a planta mutante teve acréscimo não significativo de 32 % na atividade desta enzima (Fig. 10 C e 10 D). As plantas que foram tratadas com SNP exibiram a atividade enzimática 2 vezes maior que a planta controle, havendo o incremento não significativo de apenas 24 % nas plantas *sitiens*. O tratamento salino em conjunto ao SNP aumentou 1,4 vezes a atividade desta enzima em plantas normais e 32 %, de forma não significativa, em plantas mutantes. O tratamento com tungstato, inibidor da atividade da RN e da produção de ABA, ou o tratamento de tungstato+sal não alterou significativamente a atividade da enzima em ambos os genótipos.

A antioxidante ascorbato peroxidase (APX) apresentou maior atividade em plantas mutantes, cerca de 80 % maior que a encontrada em plantas wt (pelo teste t). Plantas wt submetidas à salinidade apresentaram acréscimo de 46 % na atividade desta enzima, já as plantas mutantes apresentaram aumento de 93 % (Fig. 10 E e 10 F). O tratamento com o doador de óxido nítrico, o SNP, aumentou em 96 % e 93 % a atividade em plantas wt e mutantes, respectivamente. A atividade de APX com o tratamento NaCI+SNP foi aumentada 47 % em plantas wt e 100 % em plantas mutantes. O tratamento com tungstato não alterou significativamente a atividade da enzima APX em ambos os genótipos. A

combinação NaCI+ tungstato não alterou a atividade em plantas wt e resultou na indução de 88 % da atividade encontrada nas plantas mutantes.

A redutase do nitrato de raiz de *sitiens* apresentou atividade 20 % inferior a wt, entretanto, não sendo estatisticamente diferente (Fig. 11 A). O estresse salino reduziu de forma não significativa, a atividade de RN em plantas wt. Já nas plantas mutantes a atividade foi reduzida significativamente em 42 %. O SNP aumentou de forma não significativa a atividade em ambos os genótipos. As plantas *sitiens* submetidas ao tratamento NaCI+SNP tiveram redução não significativa da atividade de RN. O tratamento SNP+PTIO não diferiu dos controles em ambos os genótipos. O tratamento com o inibidor da atividade de RN, tungstato, reduziu a atividade em 36 e 22 % em wt e *sitiens*. A atividade da RN em plantas submetidas ao tratamento NaCI+SNP+PTIO foi reduzida de forma não significativa em ambos os genótipos.

O NaCl reduziu a atividade da RN em folhas em 48 % no genótipo wt e 56 % no mutante (Fig. 11 B). Plantas wt tratadas com SNP tiveram aumento de 32 % na atividade da RN, já nas *sitiens* este aumento foi de 54 %. O tratamento NaCl+SNP reduziu a atividade de RN em 15 %, 2 % em plantas wt e mutante, respectivamente, mantendo a atividade desta enzima semelhante ao da planta controle. O tratamento SNP+PTIO não alterou e reduziu a atividade de RN de forma significativa. A atividade da RN foi reduzida por seu inibidor em 45 % e 56 % em wt e *sitiens*. O tratamento NaCl+SNP+PTIO reduziu a atividade da RN em 44 % nas plantas WT e 53 % nas plantas *sitiens*.

A atividade hidrolítica da H⁺-ATPase tipo P em raízes de plantas wt foi incrementada em 2 vezes pelo tratamento salino e SNP (Fig. 12 A). A atividade desta enzima nas plantas tratadas com SNP+PTIO e PTIO, não foi alterada de forma significativa. O tratamento NaCI+SNP induziu a hidrólise em quase 3 vezes. O transporte de H⁺ foi aumentado pelo tratamento com sal ou com SNP. O aumento em ΔF (quantidade de prótons transportados) e na velocidade inicial de transporte de prótons (V₀) com o tratamento salino foi 48 % e 29 %, respectivamente. O tratamento com SNP aumentou o ΔF em 26 % e a V₀ em 35 %. O tratamento com SNP+PTIO aumentou em 21 % o ΔF e não modificou a V₀. O tratamento NaCI+SNP aumentou o ΔF e a V₀ em 41 % e 61 %, respectivamente (Fid. 12 B). A V-ATPase apresentou atividade incrementada pelo tratamento salino, e pelo doador de ON, entretanto, não foi significativa (Fig. 12 C). O tratamento com NaCl induziu a 42 % a atividade hidrolítica de V-ATPase em raízes. Plantas tratadas com SNP apresentaram indução de 67 % na atividade hidrolítica desta enzima. A H⁺-ATPase vacuolar foi induzida em 17 % por SNP+PTIO e reprimida em 58 % pelo tratamento com PTIO somente. O tratamento com sal e o doador de ON induziu a atividade desta enzima em 82 %. O ΔF observado para a V-ATPase aumentou 1,7 vezes em plantas tratadas com NaCl e 1 vez no tratamento com SNP. Plantas tratadas com SNP+PTIO tiveram o transporte reduzido em 50 %. O tratamento NaCl+SNP aumentou em 2,5 vezes o ΔF . A V₀ foi aumentada em 77 % e 31 % por NaCl e SNP, respectivamente. A V₀ de plantas tratadas com SNP+PTIO foi reduzida em 37%. Plantas que foram tratadas com NaCl+SNP tiveram incremento de 100 % na Vo desta enzima (Fig. 12 D).

A atividade hidrolítica da V-PPase foi aumentada por NaCI e NaCI+SNP em 1,4 vezes e por SNP em 1,8 vezes. O tratamento com SNP+PTIO induziu em 75 % a hidrólise e o tratamento com PTIO reduziu a atividade em 47 % (Fig. 12 E). O transporte de prótons promovidos pela V-PPase apresentou o ΔF e a Vo aumentados em 52 % e 43 % pela salinidade. O mesmo aconteceu em plantas tratadas com SNP apresentando acréscimos de 31 % e 35 % em ΔF e Vo, respectivamente. O tratamento com SNP+PTIO resultou na redução de 32 % em ΔF não havendo diferenças em V₀. Plantas submetidas ao NaCI +SNP apresentaram 58 % de aumento em ΔF e uma Vo 75 % maior (Fig. 12 F).

Nas plantas mutantes a atividade hidrolítica de P-ATPase em raiz apresentou-se maior durante o tratamento salino, cerca de 1,5 vezes e durante o tratamento com SNP 2,5 vezes. (Fig. 13 A). O tratamento NaCI+SNP aumentou 2,7 vezes a atividade hidrolitica de P-ATPase. O tratamento SNP+PTIO não alterou a atividade desta enzima.

A atividade hidrolitica da V-ATPase em raízes de plantas mutantes não foi alterada com o tratamento salino, entretanto, aumentou com o tratamento com SNP em 52 %. O tratamento salino combinado ao SNP resultou em uma atividade 29 % maior. O tratamento com SNP+PTIO aumentou a hidrólise cerca de 10 % (Fig. 13 B).

A V-PPase apresentou indução da atividade no tratamento com NaCI e SNP, cerca de 25 %. O tratamento destes dois tratamentos em conjunto resultou em aumento de 13 % e o tratamento com SNP+PTIO não diferiu do controle (Fig. 13 C). Não foi possível obter vesículas com atividade de transporte de H⁺ nas raízes de plantas mutantes (Fig. 13 A).

O tratamento salino em wt aumentou a fluorescência em cerca de 20 %, mostrando que possivelmente o estresse salino induz a produção de ON nestas plantas (Fig. 14). O tratamento com PTIO reduziu a fluorescência em 40 %. O tungstato, L-Name e o tratamento combinado de ambos reduziram a fluorescência em 35 %, 20 % e 40 %, respectivamente.

O tratamento salino reduziu a produção de ON nas plantas *sitiens* em 50 %. Os inibidores, tungstato e L-Name reduziram em 15 % e 30 % a fluorescência. O tratamento combinando os dois inibidores resultou no decréscimo de 38 %, e o seqüestrador de ON reduziu o sinal em 15 % (Figura 15).

Foi observado que o tomateiro *sitiens* apresenta 3 vezes o nível de RNAm da H⁺-ATPase de membrana plasmática (*LHA4*) nas raízes do tomateiro em comparação ao wt através de análise de RT-qPCR em tempo real (Fig. 16). O *LHA4* aumentou cerca de 4 vezes devido ao ON em plantas wt e apenas 25 % em plantas *sitiens*. Já a exposição ao NaCl aumentou em 50 % o nível de *LHA4* em plantas wt, enquanto que o nível do RNAm desse gene nos mutantes não foi alterado.

O aspecto visual das folhas de plantas wt e *sitiens* sob os diferentes tratamentos é apresentado na figura 17.

Os resultados estão resumidos no esquema representado na figura 18.

Discussão

As plantas mutantes apresentam a lâmina foliar significativamente menos desenvolvida em comparação às plantas wt, principalmente em função do menor desenvolvimento dos parênquimas paliçádico e lacunoso (Fig. 2). Nas plantas mutantes nota-se também no mesofilo um arranjo menos desenvolvido e menos compactado, conseqüentemente formando um mesofilo composto por um menor número de células (Fig. 2, Tabela 2).

Resultados próximos a estes foram observados no mutante *pac*, que possui redução da produção de clorofila e ABA. Nestas plantas há redução do número de células no mesofilo e aumento do espaço entre estas. Como o ABA

parece estar envolvido na diferenciação do mesofilo em parênquima esponjoso e paliçádico, é atribuído a este hormônio parte do desenvolvimento anormal deste mutante, entretanto, deve ser ressaltado que estas plantas possuem também outras carateristicas, como a redução da produção de clorofila que afeta também a diferenciação do mesofilo (Holding, et al., 2000).

Unyayar et al., (2004) observaram que quando plantas de tomateiro mutantes na produção em ABA, *notabilis*, foram tratadas com ABA exógeno havia um acréscimo no número de vasos do xilema. A aplicação de ABA reduziu a área foliar e o tamanho das células da epiderme de *Triticum aestivum* (Quarrie e Jones, 1977). Em *Tradescantia virginiana* a aplicação de ABA parece estar relacionada ao aumento do número de estômatos e a da espessura e área foliar (Franks e Farquhar, 2001). Plantas mutantes exibem área foliar reduzida além de ter menor massa seca e fresca quando comparada à planta wt (Tal, 1966).

O ABA tem sido relacionado ao desenvolvimento de raízes, caule e folhas. Entretanto, poucos trabalhos trazem o estudo anatômico em plantas mutantes na produção desse hormônio. A maior parte dos trabalhos estuda o efeito da aplicação exógena de ABA na anatomia e não a sua ausência endógena ou mesmo sensibilidade reduzida, havendo, portanto, pouquíssima literatura para utilizar como exemplo em comparações.

As taxas fotossintéticas encontradas não diferiram entre os genótipos, havendo um pequeno decréscimo nas plantas mutantes (Fig. 3A). Este decréscimo apesar de não significativo poderia ser explicado pelo aumento da concentração de sacarose encontrada nas folhas da planta mutante (Fig. 6), sendo este um fator importante na modulação da fotossíntese (Price et al., 2004; Gupta e Kaur, 2005).

A condutância estomática nas plantas mutantes é superior à encontrada na wt (Fig. 3D), sendo isto claramente explicado pelas baixíssimas concentrações de ABA (Holbrook et al., 2002; Makelã et al., 2004). Estas plantas apresentam potencial de água extremamente baixo, com baixo turgor e condutância hidráulica (Nagel et al., 1994). Como o turgor celular é importante para o fechamento estomático, estas plantas possuem seus estômatos permanentemente abertos no escuro, quando as folhas estão murchas ou mesmo quando são tratadas com acetato de fenilmercúrio, um indutor do fechamento estomático (Tal, 1966). A taxa

de transpiração em plantas mutantes encontrada é explicada pela elevada condutância estomática, favorecendo a perda de água pelos estômatos (Fig. 3C).

A razão Fv/Fm indica a proporção de luz absorvida pela clorofila *a* e que possivelmente foi utilizada em atividade fotoquímica, como tal, informa a quantidade de elétrons transportados, sendo um indicativo da fotossíntese (Baker e Rosenqvist, 2004). Foram observadas diferenças significativas entre os genótipos do rendimento quântico potencial representado pela razão Fv/Fm. O parâmetro Fv'/Fm', que indica a eficiência fotoquímica efetiva, também mostrouse menor no genótipo mutante (Fig. 4A). Estes resultados podem ser atribuídos às características deste genótipo como, o baixo conteúdo relativo de água que afeta de forma considerável proteínas relacionadas à fotossíntese (Chaves et al., 2002)

A relação Fv/Fm é determinada pela rapidez na remoção ou transferência de elétrons da quinona receptora do FSII. Baixas taxas de TRTE refeltem na redução de Fv/Fm, estes fatos são relacionados com a taxa de consumo dos produtos do transporte fotossintético de elétrons, ATP e NADPH. O decréscimo na eficiência de carboxilação pode ser um dos fatores que explicam a redução da taxa de consumo de ATP e NADPH (Baker e Rosenqvist, 2004). A restrição no consumo de elétrons pode resultar em decréscimo de Fv/Fm e aumento de NPQ. Plantas mutantes apresentaram redução em Fv/Fm, maior NPQ e redução na TRTE (Fig. 4). Maiores valores de NPQ podem indicar uma menor eficiência de utilização da energia no ciclo de Calvin.

A plantas mutantes também apresentaram menor qP (Fig. 4C). O qP representa a extinção da fluorescência para processos fotoquímicos, ou que mais energia foi extinta em processos primários das reações fotoquímicas. Maior qP sugere que a ativação das enzimas de carboxilação foi mais rápida na planta wt (Krause e Weis, 1991). Desta forma, pode ser afirmado que a eficiência do fotossistema de plantas mutantes é deficitária, além disto, devido a elevadas taxas de transpiração, possivelmente a eficiência do uso da água durante a fotossíntese é muito menor, sendo este um dos fatores que contribuem para as características destas plantas para redução do crescimento e desenvolvimento nestas plantas.

Plantas mutantes apresentaram altas concentrações de açúcares solúveis nas folhas e raízes em comparação com as plantas wt (Figs. 5 e 6). O aumento

das concentrações destes açúcares pode estar relacionado ao ajuste osmótico nestas plantas. O acúmulo de açúcares é relatado em algumas plantas e parece estar relacionado à resistência destas ao estresse osmótico (Chaves et al., 2008). Neste caso, mesmo sem o estresse abiótico, o acúmulo se deve à tentativa de manter o equilibrio osmótico celular devido à condutância estomática e taxas de transpiração destas plantas (Tal, 1966).

A redução na concentração de clorofila é um dos efeitos primários da salinidade sobre a fotossíntese durante o estresse salino (Salama et al.,1994). O tratamento salino reduziu as concentrações de clorofila a de forma significativa nas plantas mutantes, entretanto, não na planta wt. (Fig. 7B). A redução dos teores de clorofila durante o estresse osmótico é resultante do aumento na degradação ou inibição da síntese deste pigmento (Sultana et al., 1999; Santos, 2004). A redução dos pigmentos fotossintéticos é relatada principalmente em genótipos mais sensíveis a mudanças osmóticas (Moran et al., 1994; Loggini et al., 1999).

O tratamento com o doador de ON manteve as concentrações de clorofila *a* em plantas mutantes tratadas com NaCl semelhante ao controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhang et al., (2006), no qual plantas de milho tratadas com NaCl tiveram redução dos teores de clorofila total, sendo este efeito revertido pelo tratamento com SNP. Graziano et al., (2002) observaram aumento da concentração de clorofila pelo tratamento com SNP em plantas deficientes em ferro, sendo este aumento acompanhado pelo acúmulo de transcritos da proteína D1 e de uma subunidade de rubisco.

Os carotenóides são pigmentos acessórios na absorção e transferência de energia radiante, e protetores da clorofila no tocante à foto oxidação (Gilmore, 1997). O teor de carotenóides encontrado em plantas *sitiens* é maior que o encontrado em plantas wt, sendo este acrescido com o tratamento salino (Fig. 7C). A via de produção de ABA tem como precursor os carotenóides, sendo esta talvez a explicação para acúmulo dos precursores em plantas mutantes na produção deste hormônio. O carotenóide zeaxantina é um dos percursores na rota de síntese de ABA, está presente em altas concentrações em plantas mutantes de Arabdopisis na produção de ABA (*aba*) (Rock e Zeevaart, 1991; Rock et al., 1992).

Plantas submetidas à salinidade apresentam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que reagem com lipídicos produzindo compostos como o malondialdeído (MDA). Em decorrência da peroxidação lipídica, os níveis de MDA aumentam durante o estresse e, portanto são utilizados como indicativo de danos sofridos pelos tecidos vegetais (Hernandez e Almansa, 2002). Plantas mutantes tiveram aumento significativo das concentrações de MDA em raízes e folhas com o tratamento salino (Fig. 8) Estas plantas são sensíveis ao estresse salino (Makelã et al., 2004), devido à baixa condutância hidráulica e reduzido potencial de água nas folhas e raízes. Possivelmente devido ao estresse iônico combinado ao estresse osmótico gerado houve maior indução de espécies reativas de oxigênio resultando em maiores concentrações de MDA.

O aumento de MDA em plantas mutantes também pode indicar menor proteção e eficiência dos mecanismos de eliminação de radicais livres contra os danos oxidativos gerados pelo estresse salino. Interessante ressaltar que a atividade de enzimas antioxidantes nas plantas mutantes é muito maior que a encontrada em plantas wt, entretanto, a porcentagem de aumento destas atividades durante o estresse salino foi menor nas plantas mutantes, com exceção da APX (Fig. 10C). Possivelmente a produção de radicais livres, como o peróxido, é alta nestas plantas explicando, desta forma, a alta atividade das enzimas em condições normais de crescimento Estas plantas mutantes apresentaram altas taxas de produção de peróxido, entretanto, durante o estresse biótico (Asselbergh et al., 2007), sendo portanto necessário o estudo das concentrações deste radical livre também em condições de estresse abiótico

O tratamento com SNP minimizou os efeitos do sal sobre a peroxidação lipídica das plantas mutantes (Fig. 8), sendo este efeito atribuído ao aumento de enzimas antioxidantes geradas pelo tratamento com ON (Fig. 10). Resultados semelhantes foram observados por Li et al., (2008) e Zhao et al., (2007), no qual foi verificado a redução dos níveis de MDA em plantas tratadas com um doador de ON.

A integridade em raízes e folhas foi afetada pelo estresse salino em ambos os genótipos havendo redução significativa apenas em plantas mutantes (Fig. 9). A integridade em folhas de plantas mutantes foi drasticamente afetada pela salinidade, talvez por ser esta, a área que foi primeiramente e intensamente afetada durante estresse osmótico (Jia et al., 2002). O tratamento com doador de ON minimizou os efeitos do sal. (Fig. 9), possivelmente por reduzir o estresse oxidativo gerado (Fig. 10). Resultados semelhantes foram encontrados em folhas de milho expostas ao estresse salino no qual foi observado a redução do extravasamento de eletrólitos, ou seja manutenção da integridade de membranas, pelo tratamento com SNP (Zhang et al., 2006; Li et al., 2008).

A atividade de enzimas antioxidantes foi estimulada pelo sal no genótipo wt, entretanto, no mutante deficiente na produção de ABA o tratamento salino não causou mudanças significativas (Fig. 10). O ABA é relatado como sinalizador da via de indução de enzimas antioxidantes (Jiang e Zhang, 2001), entretanto, há controvérsias da participação deste hormônio e das EROs na indução dos mecanismos antioxidativos. Existem trabalhos no qual o ABA induz a produção de EROs, ou seja, este hormônio atua upstream das EROs na via de indução e expressão de enzimas antioxidantes (Guan e Scandalios, 2000; Jiang e Zhang, 2002; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2007). Entretanto, há autores que acreditam que a produção de ABA é estimulada pela presença das EROs durante o estresse, sendo a atuação deste hormônio downstream às EROs (Shninozaki e Yamaguchi-Schinozaki, 1997). De acordo com os resultados encontrados possivelmente durante o estresse, a presença de ABA é necessária para indução da atividade de enzimas antioxidantes (Fig. 10), sendo este fato comprovado com o inibidor da síntese de ABA, o tungstato. Na figura 10 pode ser observado que o tratamento salino combinado ao tungstato inibiu a ação promovida pelo NaCl, sendo possível inferir que a atuação do ABA seria upstream das EROs na inducão das enzimas antioxidantes. Nas plantas mutantes onde a produção de ABA é baixa, o tratamento com sal ou sal+tungstato não modificou a atividade enzimática. Entretanto, assim como na planta wt, o ON induziu em sitiens a atividade de todas as enzimas analisadas, evidenciando a participação de ON abaixo (downstream) do ABA e que possivelmente há rotas de indução de enzimas antioxidantes independentes da produção de ABA, uma vez que plantas mutantes apresentam alta atividade destas enzimas.

A "produção" de ON é elevada em plantas *sitiens*, sendo esta molécula possivelmente a responsável pelas altas atividades destas enzimas em uma rota independente da produção de ABA, entretanto, há necessidade de novos experimentos para investigar esta hipótese. Estes resultados estão de acordo com Zhang et al., (2007), no qual o óxido nítrico induzido por H₂O₂ na via de

sinalização promovida pelo ABA parece atuar como indutor da atividade de enzimas antioxidantes.

O tratamento salino reduziu a atividade da enzima RN em ambos os genótipos (Fig 11), entretanto, a atividade em raízes de plantas wt não foi afetada significativamente (Fig. 11 A). O decréscimo em ambos os genótipos foi maior nas folhas, semelhante aos resultados encontrados por Debouba et al., (2007), no qual estes autores observaram a redução da atividade da RN nas folhas mas não nas raízes de tomate durante o estresse salino.

Nas plantas mutantes houve o decréscimo da atividade de RN também nas raízes possivelmente devido a estado osmótico desta planta que afeta de maneira significativa a atividade desta enzima (Viegas et al., 1999). O estresse salino além de alterar a osmolaridade celular (Viegas et al., 1999), reduz a concentração de nitrato, sendo este um dos fatores atribuídos à inibição da atividade desta enzima (Abd-El Baki et al., 2000; Debouba et al., 2007).

A fluorescência relativa à presença de ON foi aumentada com o tratamento salino no genótipo wt (Fig. 14), resultados semelhantes foram encontrados por Zhang et al., (2006), que observaram o aumento transiente de ON em folhas de milho tratadas com NaCI. Durante o estresse salino as concentrações de ABA e EROs aumentam nas raízes e estas duas moléculas têm sido correlacionadas positivamente com o aumento de ON (Zhang et al., 2007). O tratamento com tungstato, o inibidor da síntese de ABA e da enzima RN, reduziu significativamente a fluorescência, mostrando que esta enzima, bem como provavelmente a presença de ABA, é responsável em parte pela síntese de ON em plantas wt sob condições normais e possivelmente durante o estresse salino.

A planta mutante apresenta maior fluorescência de DAF-2 que as plantas wt (pelo teste t). Entretanto, na presença de NaCl, houve a redução da fluorescência (Fig.15). Este fato pode ser atribuído à redução drástica da atividade da RN durante o estresse salino nestas plantas e a falta da produção de ABA nestas condições (Fig. 11). O tratamento com tungstato também reduziu parcialmente a fluorescência durante condições normais mostrando que a RN esta relacionada à sintese de ON nestas plantas.

Com base nos resultados pode-se inferir que a RN é responsável pelo acréscimo de ON nas raízes durante o estresse salino, entretanto, não pode ser descartada a hipótese da participação de NOA1 na produção de ON durante o estresse salino, uma vez que Zhao et al., (2004), obseraram a redução da atividade de NOA e da fluorescência de DAF durante o estresse em raízes de Arabidopsis.

Dentre os processos de resposta ao estresse salino estão a compartimentalização do Na⁺ no vacúolo e sua exclusão do citoplasma, ambos altamente dependentes do gradiente eletroquímico gerado pelas bombas de H⁺ nas membranas celulares (Binzel e Ratajczak, 2002). Tanto a atividade de hidrólise das bombas quanto o transporte de H⁺ realizado por elas foram estimulados pela aplicação exógena de NaCl (Fig. 12). A regulação da H⁺-ATPase de membrana e de vacúolo, bem como a da H⁺-PPase vacuolar em resposta ao NaCl foi demonstrada por outros autores (Matsumoto e Chung., 1988; Barkla et al., 1999; Zhang et al., 2006; Janicka-Russak et al., 2007). A ativação dessas enzimas durante a exposição ao sal poderia ser mediada por ON? Os resultados de Zhao et al., (2004) sugerem que sim. Os autores demonstram que existe uma ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática tanto sob tratamento com NaCI quanto com SNP em calos de Phragmites communis resistentes à salinidade. Quando aplicados em conjunto, SNP e sal ativaram ainda mais a ATPase. Os calos não resistentes mantiveram um nível alto de ativação quando sal e SNP foram aplicados em conjunto, mas ainda menor do que a aplicação isolada de NO. Nesse caso é possível que o NO tenha induzido a uma maior resistência ao estresse na espécie suscetível. O ON foi capaz de aumentar o transporte de H⁺ de maneira semelhante ao sal (Fig. 12). A aplicação conjunta de NaCl e NO aumentou a atividade de hidrólise em todas as enzimas no mesmo patamar da aplicação isolada desses tratamentos. Vale ressaltar que o transporte de H⁺ foi afetado de maneira semelhante, com aparente efeito sinergístico somente na V-ATPase. É possível que as bombas sejam ativadas pelo NaCI de maneira dependente do ON em plantas de tomate.

A quantidade de ABA aumenta em raízes durante o estresse salino (Binzel e Dunlap, 1995; Janicka-Russak et al., 2007). Alguns genes são regulados positivamente ou negativamente pela presença de sal (>100 mM de NaCl) através do aumento de ABA (Binzel e Dunlap, 1995). As atividades de hidrólise e de transporte de H⁺ das ATPase de membrana plasmática de vacúolo são aumentadas tanto por 200 mM de NaCl quanto por 50 μ M de ABA em raízes de pepino (Janicka-Russak et al., 2007). Por outro lado, a acumulação de transcritos para a subunidade A da V-ATPase não é dependente da presença de ABA como parece ser o nível de transcritos para a H⁺-ATPase de membrana plasmática (Binzel e Dunlap, 1995; Janicka-Russak et al., 2007).

Apenas a aplicação exógena de ABA, no entanto, poderia não ser bom indicativo da sua influência sobre a atividade das bombas de H⁺. O efeito do sal e do NO observado nas enzimas de plantas wt seria o mesmo em plantas deficientes na produção de ABA? Os dados apresentados na Figura 13 mostram que não: (1) O perfil de respostas das 3 enzimas em relação ao tratamento foi qualitativamente diferente nas plantas mutantes; (2) quantitativamente existe uma diferença muito grande entre wt e *sitiens*, onde o último possui atividade de hidrólise muito maior; (3) embora a P-ATPase e V-PPase sejam ativadas por NaCl e NO, a V-ATPase só é ativada por ON ou ON +NaCl. A ausência de ABA, portanto, altera o balanço de ativação das bombas. Além disso, não foi possível observar nenhuma atividade de transporte de H⁺ nas plantas *sitiens*, mostrando que a ausência de ABA também alterou a capacidade das raízes em se proteger contra o estresse oxidativo, que pode ter afetado a estabilidade das membranas, fato crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico.

No presente trabalho foi avaliada a expressão relativa do RNAm do gene LHA4 de tomate (*Lycopersicum esculetum* H⁺-ATPase isoforma 4 de membrana plasmática) (Fig. 16). A expressão relativa baseou-se na relação de expressão do gene alvo (LHA4) em relação ao gene de referência tubulina (TUB). Essa abordagem é adequada para maior parte das finalidades de investigação de mudanças fisiológicas prováveis no nível de expressão gênica (Pfaffl et al., 2002).

Apesar dos relatos de mudanças moderadas na atividade das bombas de H⁺ em relação ao estresse salino (Hassidim et al., 1986; Janicka-Russak e Klobus, 2007), existem poucos exemplos da regulação da H⁺-ATPase do tipo P em nível de transcrição (Gaxiola et al., 2007). Sabe-se que a salinidade tem influência direta nos níveis endógenos de fitormônio, em especial o ABA e auxina (Binzel e Dunlap, 1995). Em plantas wt de tomate o nível de transcritos para PM ATPase (isoforma *LHA1*) é aumentado pela exposição das plantas por 24h a 150 mM de NaCl (Binzel, 1995). Até onde se sabe, não existe nenhum estudo relatando a influência da ausência do ABA endógeno no nível transcrito da ATPase de membrana plasmática. No presente trabalho pode-se observar que o mutante em ABA possui um nível de expressão de RNAm em raízes quase 3

vezes maior do que plantas wt (Fig. 16). O efeito do ON no nível de transcritos para a ATPase foi bastante pronuciado, alcançando um estímulo na expressão relativa de 4 vezes nas plantas wt. Interessante observar que as plantas *sitiens* quando crescidas na presença de ON ativaram o nível dos mesmos transcritos em apenas 25 %. O nível endógeno de transcritos parece ser suficientemente alto no mutante, acarretando certa insensibilidade do mesmo ao tratamento com ON no que tange à expressão do RNAm da H⁺-ATPase. Em plantas wt o nível de transcritos foi aumentado em 50 % na preseça de NaCl, enquanto que em plantas *sitiens* não houve alteração. Essa manutenção dos níveis de transcritos durante o estresse salino em plantas *sitiens* sugere que a ausência de ABA pode atrapalhar a regulação da P-ATPase em nível transcripcional.

Em tomate, o efeito estimulatório de açúcares (glicose, frutose e sacarose) na expressão da isoforma *LHA4* da H⁺-ATPase parece ser específico, já que o estresse osmótico induzido por manitol e 3-ometil glicose não alterou a expressão dessa isoforma (Mito et al., 1996). Os autores observaram ainda que a abundância de transcritos para o gene *LHA4* tem boa relação com o crescimento (aumento de 2,5 vezes em tecidos em expansão). A seqüência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *LHA1* e *LHA4* tem elevada similaridade (95 %) com a seqüência do gene PMA4 de tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia*). Essa isoforma de ATPase de membrana quando expressa em tabaco, em uma forma constitutivamente ativa, resultou em plantas com crescimento superior e com tolerância à salinidade aumentada (Gévaudant et al., 2007).

Foi possível observar um aumento no acúmulo de glicose, frutose e sacarose em *sitiens* em relação ao wt. Isso se correlaciona fortemente com a indução da atividade e níveis de transcritos observados para ATPase. Existe uma relação clara entre a ausência de ABA, aumento no nível de açúcares e a regulação da atividade da H⁺-ATPase tanto em nível transcripcional quanto pós-traducional estabelecidos pela primeira vez nesse trabalho.

Conclusão

Com base nos resultados foi possível observar que o genótipo mutante apresenta diferenças na fluorescência da clorofila, entretanto isto não se refletiu em redução significativa na taxa fotossíntetica. Estas plantas mostraram grande susceptibilidade ao estresse salino, sendo este fator explicado por características inerentes a este genótipo e possivelmente em função da redução da produção de ON observada nas raízes desta planta. A produção durante o estresse salino em raízes foi atribuído, em grande parte a RN, pelo fato desta enzima ser reduzida de forma considerável durante o estresse em plantas mutantes.

Foi possível observar que o ABA é necessário na indução de enzima antioxidante em plantas wt e que durante o estresse salino possivelmente o ON atue como sinalizador abaixo (*downstream*) do ABA na sinalização da via promovida por este hormônio. Já nas plantas mutantes o estresse salino não induziu a atividade destas enzimas, sendo isto atribuído à redução da produção de ON, levando a inferir que o ON participe na indução de enzimas antioxidantes também na ausência do ABA, participando possivelmente de uma via independente de ABA.

O ON minimizou efeitos danosos provocados pelo tratamento salino reduzindo a peroxidação lipídica e mantendo a integridade de membranas, sendo estes fatores atribuídos à indução das antioxidantes e das bombas de prótons participando como modulador das respostas geradas durante o estresse. O balanço da ativação entre as bombas de H⁺ associado à síntese de ON pode compor um dos mecanismos de controle de resposta ao estresse salino em plantas de tomateiro.

Referências Bibliográficas

- Abd-ElBaki, G.K., Siefritz, F., Man, H.M., Weiner, Haldenhof, F. R., Kaiser, W.M. (2000) Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell and Environment*, 23:515-521.
- Aroca, R., Alguacil, M. M., Vernieri, P., Ruiz-Lozano, J. M. (2008) Plant Responses to drought stress and exogenous ABA application are modulated differently by mycorrhization in tomato and an ABA-deficient Mutant (*Sitiens*). *Microbial Ecology*, 56:704-719.
- Asselbergh, B., Curves, K., França. S.C., Audenaert, K., Vuylsteke, M. Breusegem, F.V., Hofte, M. (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modification in the epiderm. *Plant Physiology*, 144, 1863-1877.
- Baker, N., Rosenqvist, E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55, p. 1607-1621.
- Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Maldonado-Gama, M., Pantoja, O. (1999) Abscisic acid induction of vacuolar H⁺-ATPase activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is developmentally regulated. *Plant Physiology*, 120:811–20.
- Bartels, D., Sunkar, R. (2005) Drougth and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24:23-58.
- Beligni, M. V., Lamattina, L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210:215-21.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L. (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16: 332-341.
- Binzel, M.L., Dunlap, J.R. (1995) Abscisic acid does not mediate NaCl-induced accumulation of 70-kDa subunit tonoplast H⁺-ATPase message in tomato. *Planta*, 197:563–568.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, 72:255-260.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2008) Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation Mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 3:1-10.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L, Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L, Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C. (2002) How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89:907–916.
- Crawford, N.M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y.M., Okamoto, M. Mack, A. (2006) Response to Zemojtel et al.: Plant nitric oxide: back to square one. *Trends in Plant Science*, 11: 26-527.
- Deak, K. I., Malamy, J. (2005) Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal*, 43:17-28.
- Debouba, M., Maaroufi-Dghimi, H., Suzuki, A., Ghorbel, M. H., Gouia, H. (2007) Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. *Annals* of *Botany*, 99: 1143-1151.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A, Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394: 585-588.
- Delledonne, M.; Zeier, J.; Marocco, A.; Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant

hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:13454-13459.

- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., Neill, S. (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:16314-16318.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A (1981) Leaf senescence: correlatated with increases levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreases levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32:93-101.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:10328-10333.
- Façanha, A.R, De Méis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺pyrophosphatase in tonoplast cesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology*, 116:1487-1495.
- Ferreira, D.F. (1999) Programa Estatístico Sisvar (software). Lavras, UFLA.
- Ferrer, M.A.;, Barceló, A.R. (1999) Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Environ*, 22: 891-897.
- Fiske, C.F., Subbarow, Y. (1925) The colorometric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66: 375.
- Franks, P. J., Farquhar, G. D. (2001) Effects of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. *Plant Physiology*, 125, 935-942.
- Garcia-Mata, C., Lamattina L. (2003) Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure- is nitrate reductase one of the missing links? *Trends in Plant Science*, .8: 20-26.
- Gaxiola, R.A, Palmgren, M.G, Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581: 2204-2214.
- Gévaudant, F., Duby, G., von Stedingk, E., Zhao, R., Morsomme, P., and Boutry, M. (2007) Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. *Plant Physiology*, 144: 1763–1776.
- Giannini, J. L., Briskin, D. P. Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*, 84:613. 1987.

- Gilmore, A.M. (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle- dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum*, 99, 197–209.
- Gouvea, C.M.C.P.; Souza, J.F.; Magalhaes, M.I.S. (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, 21:183-187.
- Graziano, M., Beligni, M.V., Lamattina, L. (2002) Nitric oxide improves iron availability in plants. *Plant Physiology*, 130:1852-1859.
- Groot, S. P. C., Karssen, C.M. (1992) Dormancy and Germination of Abscisic Acid-Deficient Tomato Seeds. *Plant Physiology*, 99:952-958.
- Guan, L., Scandalios, J.G. (2000) Cis-elements and transfactors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H2O2 is likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal*, 22: 87–95.
- Guo, F.Q., Okamoto, M., Crawford, N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302: 100-103.
- Gupta, A.K, Kaur, N. (2005) Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci*, 30:101–116.
- Hassidim, M., Braun, Y., Lerner, H.R., Reinhold, L. (1986) Studies on H-Translocating ATPases in Plants of Varying Resistance to Salinity: II. K Strongly Promotes Development of Membrane Potential in Vesicles from Cotton Roots. *Plant Physiology*, 81: 1057-1061.
- Hernandez, J.A., Almansa, M.S. (2002) Short'term effects of salt stress on antioxidant system and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, 155:251-257.
- Holbrook, N.M., Shashidhar, V.R., James, R.A., Munns, R. (2002) Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *Journal of Experimental Botany*, 53:1503-1514.
- Holding, D. R., Springer, P. S., Coomber, S. A. (2000) The Chloroplast and Leaf Developmental Mutant, *pale cress*, Exhibits Light-conditional Severity and Symptoms Characteristic of its ABA Deficiency. *Annals of Botany*, 86: 953-962.
- Janicka-Russak, M., Klobus, G. (2007) Modification of plasma membrane and vacuolar H+-ATPases in response to NaCl and ABA. *Journal of Plant Physiology*, 164: 295–302.
- Jaworski, E.K. (1971) Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical* and *Biophysical Research Communications*, 43:1274-1279.

- Jiang, M., Zhang, J. (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidante damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiology*, 42: 1265-1273.
- Jiang, M., Zhang, J. (2002) Role of abscisic acid in water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Radical Research*, 36:1001-1015.
- Jia, W., Wang, Y., Zhang, S., Zhang, J. (2002) Sat-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in root than in shoots. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2201-2206.
- Krause, G.H., Weis, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis (1991) The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313-349.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolsk, A., Besson, A. P; Wendehenne. (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca⁺² concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 40:1369-1376.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebun-Guarcia, A. Durner, J., Pugin, A., Wendehenne, D. (2004) Analyses of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology*, 135: 516-529.
- Li, Q.Y., Niu, H.B., Yin, J., Wang, M.B, Shao, H.B., Deng, D.Z., Chen, X.X., Ren, J.P., Li, Y.C. (2008) Protective role of exogenous nitric oxide against oxidativestress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare L*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65: 220-225.
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E., Navari-Izzo, F. (1999) Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology*, 119: 1091–1099.
- Magalhaes, J.R., Monte, D.C., Durzan, D. (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidospis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 6: 117-127.
- Makela, P., Munns, R., Colmer, T., D., Pelotonen-Sainio, P. (2003) Growth of tomato and an ABA-defeicient mutant (*sitiens*) under saline conditions. *Physiologia Plantarum*, 177:58-63.
- Matsumo, H., Chung, G.C. (1988) Increase in proton-transport activity of tonoplast vesicles as an adaptive response of barley roots to NaCl stress. *Plant Cell Physiology*, 29: 1133-1140.
- Mito, N., Wimmers, L.E., Bennett, A.B. (1996) Sugar regulates mRNA abundance of H⁺-ATPase gene family members in tomato. *Plant Physiology*, 112: 1229–1236.

- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Orma, I., Frechilla, S., Klucas, R.V, Aparicio-Tejo, P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194:346–352.
- Murgia, I., Delledonne, M., Soave, C. (2002) Nitric oxide mediates iron-mediated ferritin accumulation in Arabidopsis. *Plant Journal*, 30: 521-528.
- Nagel, O.W., Konings, H., Lambers, H. (1994) Growth rate, plant development and water relations of theABA-defident tomato mutant *sitiens*. *Physiologia Plantarum*, 92:102-108.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T. (2002) Nitric oxide is a novel compound of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, 128:13-16.
- Neill, S. Barros, R., Brigth, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., Wilson, I. (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress, *Journal of Experimental Botany*, 59:165-176.
- Ni, B.R., Bradford, K.J. (1993) Germination and Dormency of Abscisic Acid- and Gibberellin-Deficient Mutant Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seeds. *Plant Physiology*, 101:607-617.
- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L., Lombardo, M.C., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide mediates the indole acid induction of a mitogen-actived protein kinase cascade involved in adventious root development. *Plant Physiology*, 135: 279-286.
- Pagnussat, G.C, Lanteri, M.L, Lamattina, L. (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in acetic acid induced adventitious rotting process. *Plant Physiology*, 132:1241-1248.
- Price, J., Laxmi, A., Martin, S.K., Kang, J.C. (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2128–2150.
- Ratajczak, R. (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H(⁺)translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica acta*, 1465: 17-36.
- Pfaffl, M.W., Hageleit, M. (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT–PCR. *Biotechnol. Lett.*, 23: 275–282.
- Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, L. Dempfle. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30: 1-10.
- Quarrie, S.A., Jones, H.G. (1977) Effects of abscisic acid and water stress on development and morphology of wheat. *Journal of Experimental Botany*, 28:192–203.
- Rock, C.D., Bowlby, N., Benning, S.H., Zeevaart, A.D. (1992) The ABA mutant of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh has reduced chlorophyll fluorescence yields and reduced thylakoid stacking. *Plant Physiology*, 100:1796-1801

- Rock, C.D., Zeevaart, J.A.D (1991) The ABA mutant *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88:7496-7499.
- Salama, S., Trivedi, S., Busheva, M., Arafa, A.A., Garab, G. and Erclei, L. (1994) Effects of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplast structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance. *Journal Plant Physiology*, 144: 241-247.
- Santos, C.V. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulture*, 103:93-99.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiology*, 115: 327–334.
- Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessiccation. *New Phytologist*, 125:27-58.
- Song, L., Ding, W., Zhao, M., Sun, B., Zhang, L. (2006) Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Science*, 171:449-458.
- Spollen, W.G., LeNobre, M.E., Samuels, T.D., Bernstein, N., Sharp, R.E. (2000) Abscisic Acid Accumulation maintains maize primary root elongation at low water potencials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*, 122:967-976.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R., Rockel, P. (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212: 835-841.
- Stöhr, C., Stremlau, S. (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 57: 463-470.
- Stöhr, C., Ullrich, W.R. (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2293-2303.
- Sultana, N., Ikeda, T., Itoh, R. (1999) Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environmental and Experimental Botany*, 42: 211-220.
- Takahashi, S., Yamasaki, H. (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Letters*, 512:145-148.
- Tal, M. (1966) Abnormal Stomatal Behavior in wilty Mutants of Tomato. *Plant Physiology*, 41: 1387-1391.
- Taylor, I.B., Burbidge, A., Thompson, A.J. (2000) Control of abscisic acid synthesis, *Journal of Experimental Botany*, 51:1563-1574.

- Unyayar, S., Aktoklu, E., Büyükask, Y. (2004) The response to exogenous abscisic acid of the roots of notabilis and its wild-type tomato under drought stress. *Journal of Plant Sciences*, 52: 293-299.
- Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham, Thi, A.T., Viera de Silva, J.B. (1990) Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *Journal* of *Experimental Botany*, 228: 827-832.
- Viegas, R. A., Melo, A.R.B., Silveira, J.A.G. (1999) Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew (*Annacardium occidentale* L.) in response to salt (NaCl) shock. *Brasilian Journal of Plant Physiology*, 11:21-28.
- Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Yingli, Y., Li, B., Zhang, L. (2004) Nitric Oxide Function as a Signal in Salt Resistence in the Calluses from Two Ecotypes of Reed. *Plant Physiology*, 134:849-857.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y., Zhang, W.H. (2007) Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 144: 206-217.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, S., Tan, M. (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist*, 175:36-50.
- Zhang, J., Kirkham, M.B. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology*, 35:785-791.
- Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Wei, Q.; Zhang, W. (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na/H antiport in the tonoplasto. *Planta*, 224: 545-555.
- Zhu, D., Scandalios, J.G. (1994) Differentail accumulation of manganesesuperoxide trnascropts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiology*, 106:173-178.
- Zorb, C., Noll, A., Karl, S., Leib, K., Yan, F., Schubert, S. (2005) Molecular characterization of Na⁺/H⁺ antiporters (ZmNHX) of maize (Zea mays) and their expression under salt stress. *Journal Plant Physiology*, 162: 55-66.
- Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Lo Schiavo, F., Terzi, M. (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Letters*, 515: 75-78.



Controle (wt)

Mutante (Sitiens)

Figura 1- Foto ilustrativa dos genótipos de tomateiro Solanum lycopersicum L.



Figura 2. Corte transversal da lâmina foliar de *L. sp.* (A) Planta controle (wt), (B) Planta mutante *sitiens*. Fv: feixes vasculares. St: estômatos. Barra: 50 µm.

106

Medidas Foliares	Genótipo	Média ± S.D.
		400 44
Espessura da lâmina (µm)	Wt	183 ± 41
	sit	117 ± 23 *
		450 00
Espessura do mesofilo (µm)	Wt	156 ± 36
	sit	99 ± 21 *
Espessura parênguima palicádico (um)	wt	81 ± 19
	sit	50 ± 13 *
Espessura parênguima esponioso (um)	wt	76 ± 25
	sit	49 ± 14
Espessura da epiderme adaxial (um)	wt	16 ± 5
	sit	12 ± 4
Espessura da epiderme abaxial (um)	wt	12 ± 5
	sit	10 ± 3 *

Tabela 2- Cortes transversais em folhas de plantas de tomateiro controle (wt) e mutantes *sitiens* (sit). *P < 0.05 pelo Teste t de Student.



Figura 3– Medidas da taxa de fotossíntese e trocas gasosas em plantas de tomateiro controle (wt) e *sitiens*. (A) Taxa fotossintética; (B) Déficit de pressão de vapor entre folha-ar (DPV); (C) Transpiração; (D) Condutância estomática. Os dados representam médias \pm desvio padrão: **P*<0,05, pelo Teste t de Student.



Figura 4– Medidas da fluorescência da clorofila *a* em plantas de tomateiro controle (wt) e mutante *sitiens*. (A) Fv/Fm e Fv'/Fm'; (B) NPQ; (C) qP; (D) qN.; (E) Taxa relativa de transporte de elétrons (TRTE) * P <0,05 pelo Teste t de Student.

Figura 5- Teores de açúcares em raízes de tomateiro controle (wt) e mutante *sitiens*. (A) Glicose; (B) Frutose; (C) Sacarose. Os dados representam médias \pm desvio padrão: **P*<0,05, representam as diferenças significativas pelo Teste t de Student.

Figura 6- Teores de açúcares em folhas de tomateiro controle (wt) e mutante *sitiens*. (A) Glicose; (B) Frutose; (C) Sacarose. Os dados representam médias \pm desvio padrão: **P*<0,05, representam as diferenças significativas pelo Teste t de Student.

Figura 7- Teores de pigmentos em plantas controle (wt) e mutante *sitiens*. (A) Clorofila a; (B) Clorofila b. (C) Carotenóides totais. Controle, 150 mM de NaCl; 150 mM NaCl+150 μM SNP(doador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+150 μM SNP+150μM PTIO (seqüestrador de óxido nítrico). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS a 5 %. As barras representam ± desvio padrão.

Figura 8 - Concentração de malondialdeído (MDA) em plantas de tomateiro controle (wt) e *sitiens*. (A) Raízes; (B) Folhas. Controle, 150 mM de NaCl; 150 mM NaCl+150 μ M SNP(doador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+150 μ M SNP+150 μ M PTIO (seqüestrador de óxido nítrico). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS a 5 %. As barras representam ± desvio padrão.

Figura 9- Porcentagem de integridade de membranas em tomateiro controle (wt) e *sitiens*. (A); Raízes; (B) Folhas. Controle, 150 mM de NaCl; 150 mM NaCl+150 μ M SNP(doador de óxido nítrico); 150 mM de NaCl+ 150 μ M SNP+ 150 μ M PTIO (seqüestrador de óxido nítrico). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS a 5 %. As barras representam ± desvio padrão.

Figura 10- Atividade de enzimas antioxidantes em raízes de tomateiro controle (wt) e *sitiens*. (A) Enzima catalase wt; (B) Enzima catalase em *sitiens*; (C) Enzima Guaiacol Peroxidase (GPX) em wt; (D) Enzima Guaiacol Peroxidase (GPX) em *sitiens*. (E) Enzima Ascorbto Peroxidase (APX) em wt. (F) Enzima Ascorbato Peroxidase (APX) em *sitiens*. Controle, 150 mM de NaCl; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 mM NaCl+150 μ M SNP; 300 μ M tungstato (inibidor da redutase do nitrato) e 150 mM NaCl+300 μ M tungstato. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS a 5 %. As barras representam ± desvio padrão.

Figura 11- Atividade da redutase do nitrato em plantas controle (wt) e *sitiens*. (A) Raízes; (B) Folhas. Controle, 150 mM de NaCl; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 mM NaCl+150 μ M SNP; 150 μ M SNP+150 μ M PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 300 μ M tungstato (inibidor da redutase do nitrato) 150 mM de NaCl+150 μ M SNP+150 μ M PTIO. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS a 5 %. As barras representam ± desvio padrão.

Figura 12- Atividade hidrolítica de ATP e de transporte de H+ de ATPases e PPase em raízes de plantas controle (wt). (A); Atividade hidrolítica de ATP de P-ATPase; (B) Transporte de H+ em P-ATPase; (C) Atividade hidrolítica de ATP de V-ATPase; (D) Transporte de H+ em V-ATPase; (E) Atividade hidrolítica de ATP de PPase; (F) Transporte de H+ em PPase. Controle, 150 mM de NaCI; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 mM NaCI+150 μ M SNP ; 150 μ M SNP+150 μ M PTIO (seqüestrador de óxido nítrico); 150 μ M PTIO ;150 mM de NaCI+150 μ M SNP. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS a 5 %. As barras representam ± desvio padrão.

Figura 13- Atividade hidrolítica de ATP e de transporte de H+ de ATPases e PPase em raízes de plantas *sitiens*. (A); Atividade hidrolítica de ATP de P-ATPase; (B) Atividade hidrolítica de ATP de V-ATPase; (C) Atividade hidrolítica de ATP de PPase. Controle, 150 mM de NaCl; 150 μ M de SNP (doador de óxido nítrico); 150 mM NaCl+150 μ M SNP ; 150 μ M SNP+ 150 μ M PTIO (seqüestrador de óxido nítrico). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS a 5 %. As barras representam ± desvio padrão.

Figura 14 - Microscopia ótica de fluorescência em raízes de tomateiro controle (wt). Controle; 150 μ M PTIO (seqüestrador de óxido nítrico) 150 mM de NaCl; 300 μ M tungstato de sódio (inibidor da enzima redutase do nitrato); 200 μ M L-Name (inibidor da NOA1); 300 μ M tungstato+ 200 μ M L-Name. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS a 5 %. As barras representam ± desvio padrão.

Figura 15 - Microscopia ótica de fluorescência em raízes de tomateiro mutante *sitiens* Controle; 150 μ M PTIO (seqüestrador de óxido nítrico) 150 mM de NaCI; 300 μ M tungstato de sódio (inibidor da enzima redutase do nitrato); 200 μ M L-Name (inibidor da NOA1); 300 μ M tungstato+ 200 μ M L-Name. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS a 5 %. As barras representam ± desvio padrão.

Figura 15- Expressão de RNAm em plantas controle (wt) e mutantes *sitiens*, através de RT-qPCR em tempo real. Tratamentos: H₂0 (controle); 150 μM de SNP e 150 mM de NaCI. As plantas foram expostas aos tratamentos por 24h. A razão de expressão foi calculada com base no nível de expressão do gene estudado (LHA4) em plantas wt controle. Os níveis de RNAm foram normalizados em relação ao gene controle (Tubulina). As barras representam o erro calculado pelo programa REST[®].

Figura 17- Foto ilustrativa do efeito dos tratamentos em folhas de tomateiro. (A) controle (wt) (B) Mutante *sitiens*. A barra corresponde a 1 cm.

Figura 18- Modelo esquemático da participação do óxido nítrico como sinalizador durante o estresse salino.

4. RESUMOS E CONCLUSÕES

O fitormônio ácido abscísico (ABA) está relacionado à regulação de respostas adaptativas a estresses ambientais. As plantas sobre estresse salino apresentam incrementos do conteúdo de ABA, principalmente na parte radicular. O ABA está relacionado ao acréscimo de EROs e está envolvido na indução da atividade e a expressão gênica de enzimas antioxidantes. Para o estudo da participação do hormônio ABA em rotas de sinalização em plantas, têm sido desenvolvidos mutantes hormonais, como o sitiens. O óxido nítrico (ON) é um gás presente em vias metabólicas afetando os níveis de mensageiros secundários. O ON é relatado como mediador de respostas hormonais em particular mediando efeitos de hormônios e moléculas envolvidas em estresses abióticos. Neste trabalho foi possível verificar a minimização dos efeitos da salinidade em raíz e parte aérea pelo tratamento com o doador de ON em plantas de milho. O tratamento com SNP induziu a atividade de enzimas antioxidantes possibilitando a redução da peroxidação lipídica em raízes. Foi verificado aumento da produção de ON durante o estresse salino, sendo esta produção atribuída principalmente a RN e possivelmente a NOA 1. O tratamento com o doador de ON induziu também a atividade de P-ATPase, V-ATPase e PPase comprovando a hipótese da participação desta molécula na modulação de bombas de prótons. Os estudos com plantas mutantes em ABA mostraram a grande susceptibilidade ao estresse salino, sendo este fator explicado por características inerentes a este genótipo e possivelmente em função da redução da produção de ON observada nas raízes desta planta. A produção durante o estresse salino em raízes foi atribuído, em grande parte a RN, pelo fato desta ser reduzida de forma considerável durante o estresse em plantas mutantes. Foi possível observar que o ABA é necessário na indução de enzima antioxidante em plantas contorle (wt) e que durante o estresse salino possivelmente o ON atue como sinalizador abaixo na sinalização da via promovida pelo ABA. O ON minimizou efeitos danosos provocados pelo tratamento salino, reduzindo a peroxidação lipídica e mantendo a integridade de membranas, sendo estes fatores atribuídos à indução das antioxidantes e das bombas de prótons participando como modulador das respostas geradas durante o estresse. O balanço da ativação entre as bombas de H⁺ associado à síntese de ON pode compor um dos mecanismos de controle de resposta ao estresse salino. Há a necessidade de novos estudos para confirmar a participação das enzimas envolvidas na produção de ON, bem como avaliar a via não enzimática de produção de ON durante o estresse salino. É necessário também investigar se a resposta na modulação das bombas durante o estresse salino é dependente da presença de ON, ou seja, se esta molécula é essencial para a modulação de ATPases e PPase durante o estresse salino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-ElBaki, G.K., Siefritz, F., Man, H.M., Weiner, H., Haldenhof, F. R., Kaiser, W.M. (2000) Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell and Environment*, 23:515-521.
- Agastian, P., Kingsley, S.J., Vivekanandan, M. (2000) Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica*, 38: 287–290.
- Anderson, B.E., Ward, J.M, Schroeder, J.I. (1994) Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiology* 104:1177–1183.
- Apse M.P., Aharon G.S., Snedden, W.A., Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science*, 285:1256-1258.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia. Plantarum*, 85: 235-241.
- Ayala F., O'Leary, J.W., Schumaker, K.S. (1996) Increased vacuolar and plasma membrane H⁺-ATPase activities in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*, 47: 25-32.
- Bartels, D., Sunkar, R. (2005) Drougth and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24:23-58.
- Barkla, B.J., Zingarelli, L., Blumwald, E., Smith, J. (1995) Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiology*, 109: 549-556.

- Beligni, M. V., Lamattina, L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210:215-21.
- Bellaire, B.A., Carmodt, J., Braud, J., Gossett, D.R, Banks, S.W., Lucas, M.C. (2000) Involvement of abscísico acid-dependent and independent pathways in the up-regulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue. *Free Radical*, 33: 531-545.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L. (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16: 332-341.
- Binzel, M.L., Dunlap, J.R. (1995) Abscisic acid does not mediate NaCl-induced accumulation of 70-kDa subunit tonoplast H⁺-ATPase message in tomato. *Planta*, 197:563–568.
- Binzel, M.I., Ratajczak, R. (2002) Function of membrane transport systems under salinity: tonoplast. In: Salinity: Environment - Plants - Molecules, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 450p.
- Bolhàr-Nordenkamppf, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Shureiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the filed: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 3:497-514.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D. (1992) Superoxide-dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43:83-116.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., Neill, S.J. (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant Journal*, 45:113–22.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savoure, A., Verbruggen, N., Van montagu, M., Inze', D. (1998) Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Science*, 138: 27– 34.
- Camomi, L., Marra, M., Garufi, A., Visconti, S., Aducci, P. (2006) The Maize Root Plasma Membrane H⁺-ATPase is Regulated by a Sugar-induced Transduction Pathway. *Plant Cell Physiology*, 47:743-747.
- Carillo, P., Mastrolonardo, G., Nacca, F., Fuggi, A. (2005) Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity. *Functional Plant Biology*, 32:209-219.
- Chandok, M.R., Ytterberg, A. J., Van Klessig, D.F. (2003) The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell*, 113: 469-482.

- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2008) Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 3:1-10.
- Chaves, M. M., Oliveira, M.M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water déficits: propects for water-saving agriculture. *Journal of Botany*, 55: 2365-2384.
- Clark, A.J., Blissett, K.J., Oliver, R.P. (2003) Investigating the role of polyols in Cladosporium fulvum during growth under hyper-osmotic stress and in planta. *Planta*, 216: 614–619.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218: 900-905.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, E.I. (2006) Involvement of soluble sugar in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plant. *Planta*, 57:449-459.
- Cramer, G.R., Epstein, E., Lauchli, A. (1991) Effects of sodium, potassium and calcium on salt-stressed barley. II Elemental analysis. *Physiologia Plantarum*, 8: 197-202.
- Crawford, N.M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y.M., Okamoto, M. Mack, A. (2006) Response to Zemojtel et al.: Plant nitric oxide: back to square one. *Trends Plant Science*, 11: 26-527.
- Cruz, A. L., Pelacani, C. R., Soares Filho, W. S., Castro Neto, M. T., Coelho, E. F., Dias, A. T., Paes, R. A. (2003) Produção e partição de matéria seca e abertura estomática do limoeiro 'cravo' submetido a estresse salino. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 528-531.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H. Scott, I.M. (2000) Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 156:659-665.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., Neill, S. (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:16314-16318.
- Darley-usmar, V., Wiseman, H., HalliwelL, B. (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: A question of balance. *FEBS Letters*, 369:131-135.
- Davies, W.J., Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 55-76.
- Debouba, M., Maaroufi-Dghimi, H., Suzuki, A., Ghorbel, M. H., Gouia, H. (2007) Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and

ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. *Annals of Botany*, 99: 1143-1151.

- De Costa, W., Zorb, C., Hartung, W., Schubert, S. (2007) Salt resistence is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiologia Plantarum*, 131:311-321.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394:585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:13454-13459.
- Del Rio, L.A., Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Sevilla, F., Corpas, F.J., Jimenez, A., Lopez-Huertas, E., Hernandez, J.A. (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*, 116:1195-1200.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:10328-10333.
- Durner, J., Shah J., Klessig, D. F. (1997) Salicylic acid and the induction of defense genes. *Trends in Plant Sciences*, 2:266-274.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology*, 116:1487-1495.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Shankey, T.D. (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biology*, 6:269-279.
- Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Galmés, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H., Ribas-Carbo, M. (2007) Rapid variations of mesophyll condutance in response to changes in CO₂ current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environment*, 31:602-612.
- Flores, P., Botlla, M.A., Martinez, V., Cerda, A. (2000) Ionic and osmotic effects of nitrate redutase activity in tomato seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 156:552-557.
- Flowers, T.J., Troke, P.F., Yeo, A.R. (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 28: 89–121.
- Ferrer, M.A., Barceló, A.R. (1999) Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Environment*, 22:891-897.

- Foyer, C., Descourvieres, P., Kunert, K. (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanisms studied in transgenic plants. *Plant Cell Environment*, 17:507-523.
- Gadallah, M.A.A. (1999) Effects of proline and glycinebetaine on Vicia faba response to salt stress. *Biologia Plantarum*, 42: 249–257.
- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L., Blatt, M.R. (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 11116–11121.
- Garcia-Mata, C., Lamattina, L. (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126:1196–1204.
- Garcia-Mata, C., Lamattina, L. (2003) Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure- is nitrate reductase one of the missing links? *Trends in Plant Science*, 8: 20-26.
- Garcia-mata, C., Lamattina, L. (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiology*, 128:790-792.
- Gaxiola, R.A, Palmgren, M.G, Schumacher, K. (2007) Plant Proton Pumps. *FEBS Letters*, 581: 2204-2214.
- Gaxiola, R.A, Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., Fink, G.R. (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺- pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 11444-11449.
- Ghanem, M. E., Albacete, A., Martinez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R., Dodd, I.C., Lutts, S., Pérez-Alfocea, F. (2008) Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal* of Experimental Botany, 23: 1-12.
- Gilmore, A.M. (1991) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplast and leaves. *Physiologial Plantarum*, 99:197-209.
- Gouia, H., Chorbal, M.H., Touraine, B. (1994) Effects of NaCl on Flows of N and Mineral lons and on NO3- Reduction Rate within Whole Plants of Salt-Sensitive Bean and Salt-Tolerant Cotton. *Plant Physiology*, 105: 1409-1418.
- Gouvea, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhaes, M.I.S. (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, 21:183-187.
- Graziano, M., Beligni, M.V., Lamattina, L. (2002) Nitric oxide improves iron availability in plants. *Plant Physiology*, 130:1852-1859.

- Guan, L., Scandalios, J.G. (2000) Cis-elements and transfactors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal*, 22: 87–95.
- Guo, F.Q., Okamoto, M., Crawford, N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302:100-103.
- Hartung, W. (1983) The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Valerianella locusta*. *Plant Cell Environ*, 6:427-428.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-499.
- Hassidim, M., Braun, Y., Lerner, H.R., Reinhold, L. (1990) Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ antiport in root membrane vesicles isolated from the halophyte atriplex and the glycophyte cotton. *Plant Physiology*, 94: 1795-1801.
- Hernandez, J.A.; Olmos, E.; Corpas, F.J.; Sevilla, F; Del rio, L.A. (1995) Saltinduced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*, 105: 151– 167.
- Huang, X., Stettmaier, K., MicheL, C., Hutzler, P., Mueller, M.J., Durner, J. (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana. Planta*, 3: 231-245.
- Hu, X., Jian, G.M., Zhang, A., Lu, J. (2005) Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta*, 223: 57–68.
- Hu, X., Jian, G.M., Zhang, J., Zhang, A., Lin, F., Tan, M. (2007) Calcium/ calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and function both upstream and downstream of H₂O₂. *New Phystologist*, 173:27-38.
- Jiang, M., Zhang, J. (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidante damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiology*, 32: 1265-1273.
- Jinag, M., Zhang, J. (2002) Role of abscisic acid in water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Radical Research*, 36: 1001-1015.
- Jinag, M., Zhang, J. (2003) Cross-talk between calcium reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Plant Cell and Environment*, 26: 929-939.
- Kerkeb, L., Donaire, J.P., Rodriguez-Rosales, M.P. (2001) Plasma membrane H⁺– ATPase activity is involved in adaptation of tomato calli to NaCl. *Physiologia Plantarum*, 111: 483–490.

- Kluge, C., Lamkemeyer, P., Tavakoli, N., Golldack, D., Kandlbinder, A., Dietz, K.J. (2003) cDNA cloning of 12 subunits of the V-type ATPase from *Mesembryanthemum crystallinum* and their expression under stress. *Molecular Memb Biol*, 20:171-183.
- Koshland, D.J.R. (1992) The Molecule of the Year. Science, 258:1861.
- Kozlowski, T.T., Pallardy, S.G. (2002) Acclimation and responses of woody plants to environmental stresses. *Botanical Review*, 68:270-334.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42:313-349.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolsk, A., Besson, A. P., Wendehenne, L. (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca⁺² concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 40:1369-1376.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-legrand, A., Lebun-guarcia, A. Durner, J., Pugin, A., Wendehenne, D. (2004) Analyses of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology*, 135: 516-529.
- Larkindale, J., Huang, B. (2004) Thermotolerance and antioxidant systems in Agrostis stolonifera: Involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology*, 161:405-413.
- Lawlor, D.W. (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. Metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, 89:871-885.
- Lawlor, D.W., Cornic, G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25:275-294.
- Liang, J., Zhang, J., Wong, M.H. (1996) Stomatal conductance in relation to xylem sap abscisic acid concentrations in two tropical trees, *Acacia confusa* and *Litsea glutinosa*. *Plant, Cell and Environment*, 19:93-100.
- Li, J., Yang, H., Peer, W.A, Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards, E.L., Krizek, B., Murphy, A.S., Gilroy, S., Gaxiola, R. (2005) Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310: 121-125.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J.; Singel, D.J., Stamler, J.S. (1993) Redox mechanism of neuronal protection vs. killing nitric oxide and related nitrosocompounds. *Nature*, 364:626-632.
- Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Foyer, C.H., Scot, I.M. (1998) Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *Journal of Experimental Botany*, 49:713-720.

- Magalhaes, J.R., Monte, D.C., Durzan, D. (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidospis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 6: 117-127.
- Martinez, V., Lauchli, A. (1994) Salt-induced inhibition of phosphate uptake in plants of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *New Phytologist*, 126: 609-614.
- Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Kasai, M. (1992) Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminum stress: membrane-associated ATPase, aluminum and calcium. *Soil Sci. Plant. Nut.*, 38: 411–419.
- Mito, N., Wimmers, L., Bennett, A.B. (1996) Sugar Regulates mRNA Abundance of H⁺ -ATPase gene family members in tomato. *Plant Physiology*, 112:1229-1236.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 9:405-410.
- Mitsuya, S., Takeoka, Y., Miyake, H. (2000) Effects of sodium chloride on foliar ultrastructure of sweet potato (Ipomoea batatas Lam.) plantlets grown under light and dark conditions in vitro. *Journal of Plant Physiology*, 157: 661–667.
- Mohammad, M., Shibli, R., Ajouni, M., Nimri, L. (1998) Tomato root and shoot responses to salt stress under different levels of phosphorus nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 21: 1667–1680.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43:109-142.
- Munns, R., James, R.A., Lauchli, A. (2006) Approaches to increase the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57:1025-1043.
- Munns, R., Tester, M. (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *The Annual Review of Plant Biology*, 59:651–81.
- Murgia, I., Delledonne, M., Soave, C. (2002) Nitric oxide mediates iron-mediated ferritin accumulation in Arabidopsis. *Plant Journal*, 30: 521-528.
- Nagel, O.W., Konings, H., Lambers, H. (1994) Growth rate, plant development and water relations of the ABA-defident tomato mutant *sitiens*. *Physiologia Plantarum*, 92:102-108.
- Nakamura, Y., Kasamo, K., Shimosato, N., Sakata, M., Ohta, E. (1992) Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca⁺ ions. *Plant Cell Physiol*, 33:139-149.
- Nambara, E., Kawaid, H., Kamiya, K., Naito, S. (1998) Characterization of Arabidopsis thaliana mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. *Plant Cell Physiol*, 39: 853-858.
- Naumann, J.C., Young, D.R., Anderson, J.E. (2007) Linking leaf chlorophyll fluorescence properties to physiological responses for detection of salt and drought stress in coastal plant species. *Physiologia Plantarum*, 131:422-433.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T. (2002) Nitric oxide is a novel compound of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, 128:13-16.
- Newton, A.C., Mcbeath, C. (1996) The impact of desiccation on chlorophyll fluorescence in detached leaves of six tropical tree species. *Photosynthetica*, 32:491-501.
- Niu, X., Narasimhan, M.L., Salzman, R.A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1993) NaCl regulation of plasma membrane HCATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiology*, 103:713–18.
- Noritake T, Kawakita K, Doke N. (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology*, 37:113-116.
- Orozco-cárdenas, M., Ryan, C.A. (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiology*, 130:487-498.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lamattina, L. (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in acetic acid induced adventitious rotting process. *Plant Physiology*, 132:1241-1248.
- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L., Lombardo, M.C., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide mediates the indole acid induction of a mitogen-actived protein kinase cascade involved in adventious root development. *Plant Physiology*, 135:279-286.
- Park, S., Li, J., Pittman, J.K., Berkowitz, G. A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, K.D., Gaxiola, R. A (2005) Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18830-18835.
- Parry, A.D., Neill, S.J., Horgan, R (1988) Xantonin levels and metabolism in the wild-type and wilty mutants of tomato. *Planta*, 173:397-404.
- Pedroso, M.C., Durzan, D.J. (2000) Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves. *Annals of Botany*, 86: 983-994.
- Ratajczak, R. (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H(⁺)translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica acta*, 1465: 17-36.

- Rea, P.A., Kim, Y., Sarafian, V., Poole, R.J., Davies, J.M. Sanders, D. (1992) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Science*, 17:348-353.
- Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum*, 71:131-141.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanandan, M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Jounal of Plant Physiology*, 161:1189-1202.
- Reddy, M.P., Sanish, S., Iyengar, E.R.R. (1992) Photosynthetic studies and compartmentation of ions in different tissues of *Salicornia brachiata* Roxb. under saline conditions. *Photosynthetica*, 26: 173–179.
- Rockel, P., Kaiser, W.M. (2002) NO production in plants: nitrate reductase versus nitric oxide synthase. *Progress in Botany*, 63: 246-257.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006) Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57:675-709.
- Sakamoto, A., Okumura, T., Kaminata, H., Sumi, K., Tanaka, K. (1995) Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase genes, *SodCc1* and *SodCc2*, in rice protoplasts. *FEBS Letters*, 358:62-66.
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., Yamasaki, H. (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177:67-80.
- Sanchez, D.H., Siahpoosh, M.R., Roessner, U., Udvardi, M., Kopka, J. (2007) Plant metabolomics reveals conserved and and divergent metabolic responses to salinity. *Physiologia Plantarum*, 132:209-219.
- Santi, S. G., Locci, R., Monte, R., Pinton, Z. Varanini, Z. (2003) Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 54:1851–1864.
- Santi, S.G, Locci, G., Pinton, R., Cesco, S., Varanini, Z. (1995) Plasma membrane H⁺-ATPase in maize roots induced for NO₃⁻ uptake. *Plant Physiology*, 109:1277–1283.
- Sauter, A., Dietz, K.J., Hartung, W. (2002) A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to shoot signaling. *Plant Cell Environ*, 25:223-228.
- Sauter, A., Hartung, W. (2000) Radial transport of abscisic acid conjugates in maize roots: its implication for long distance stress signals. *Journal of Experimental Botany*, 51:925-935.

- Scandalios, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 101:7-12.
- Scherer, G.F.E.; Holk, A. (2000) NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regulation*, 32:345-350.
- Schroeder, J.L., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., Waner, D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 627-658.
- Sekmen, A.H., Turkan, I., Takio, S. (2007) Differential responses of antioxidative and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritime* and saltsensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum*, 131:399-411.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C. (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 50:1023-1036.
- Serrano, R., Rodriguez-Navarro, A. (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 13: 399-404.
- Sharp, R.E., LeNobre, M.E. (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, 153:33-37.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (1991) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, 115: 327-334.
- Siddiqui, N.U., Chung, H.J. Thomas, T.L. Drew, M.C. (1998) Abscisic aciddependet and independent expression of the carrot late-embryogenesisabundant-class gene Dc3 in transgenic tobacco seedlings. *Plant Physiology*, 118:1181-1190.
- Silveira, J.A.G., Melo, A.R.B., Viégas, R.A., Oliveira, J.T.A. (2001) Salt-induced effects on the nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Environmental and Experimental Botany*, 46:171-179.
- Singh, S.K., Sharma, H.C., Goswami, A.M., Datta, S.P., Singh, S.P. (2000) In vitro growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. *Biologia Plantarum*, 43: 283–286.
- Sminorff, N., Cumbes, Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28:1057-1060.
- Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessiccation. *New Phytologist*, 125:27-58.
- Spollen, W.G., LeNobre, M.E., Samuels, T.D., Bernstein, N., Sharp, R.E. (2000) Abscisic Acid Accumulation maintains maize primary root elongation at low

water potencials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*, 122:967-976.

- Sokolovski, S., Blatt, M.R. (2004) Nitric oxide block of outward-redtifing K⁺ channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cell. *Plant Physiology*, 136: 4275-4284.
- Sokolovski, S., Hills, A. Garcia-Mata, C., Lamattina, L. Blatt, M.R. (2005) Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca⁺² relase and ion channel by nitric oxide and abscísico aic in guard cell. *The Plant Journal*, 43:520-529.
- Song, L., Ding, W., Zhao, M., Sun, B., Zhang, L. (2006) Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Science*, 171:449-458.
- Stamler, J.S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78:931–936.
- Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258:1898-1902.
- Stöhr, C., Stremlau, S. (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 57:463-470.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R.; Rockel, P. (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212: 835-841.
- Stöhr, C., Ullrich, W.R. (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Biology*, 53: 2293-2303.
- Sudhir, P., Murthy, S.D.S. (2004) Effects of salt stress on basic process of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42:481-486.
- Sze, H., Ward, J. M., Lai, S., Perera, I. (1992) Vacuolar-type H⁺-translocating ATPases in plant endomembranes: subunit organization and multgene families. *Journal of Experimental Biology*, 172:132-135.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1998) *Plant Physiology*. The Benjamin/ Cummings Publishing, Redwood City, California. 363p.
- Takahashi, S., Yamasaki, H. (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Letters*, 512:145-148.
- Tal, M. (1966) Abnormal stomatal behavior in wilty mutants of tomato. *Plant Physiology*, 41: 1387-1391.
- Taylor, I.B., Burbidge, A., Thompson, A.J. (2000) Controle of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 51:1563-1574.

- Thomson, A.J., Jackson, A.C., Symonds, R.C., Mulholland, B.J., Dadswell, A.R., Blake, P.S., Burbidge, A., Taylor, B. (2000) Ectopic expression of tomato 9-cisepoxycarotenoid dioxygenases gene causes over-expression of abscísico acid. *The Plant Jounal*, 23:363-374.
- Tian, X., Lei, Y. (2006) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, 50:775-778.
- Tsiantis MS, Bartholomew D.M, Smith, J.A.C. (1996) Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H1-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum. The Plant Journal*, 9: 729–736.
- Tun, N.N., Hok, A., Scherer, G.F.E. (2001) Rapid increase of no release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters*, 509:174–176.
- USDA-ARS (2008) Research Databases. Bibliography on Salt Tolerance. George E. Brown, Jr. Salinity Lab. US Dep. Agric., Agric. Res. Serv. Riverside, CA. http://www.ars.usda.gov/Services/docs.
- Van Kooten, O., Snel, J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology *Photosynthesis Research*, 25:147-150.
- Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42:579-620.
- Wang, Y., Zhang, W., Li, K., Sun, F., Han, C., Wang, Y., Li, X. (2008) Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in *Arabdopsis thaliana. Journal Plant Res.*, 121: 87-96.
- Wang, B., Luttge, U., Ratajajczak, R. (2001) Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Experimental Biology*, 52: 2355-2365.
- Wang, Y., Marsden, P.A. (1995) Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv. Pharmacology*, 34:71-90.
- Wang, Y., Nil, N. (2000) Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in Amaranthus tricolor leaves during salt stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 623–627.
- Willadino, L.G., Camara, T.R. (2005) Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In.: *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*. MxM Gráfica e Editora. Recife – Brasil.
- Williamson, J.D., Scandalios, J.G. (1992) Differential response of maize catalases and superoxide dismutases to the photoactivated fungal toxin cercosporin. *Plant Jounal*, 2:351–358.
- Wojtaszek, P. (2000) Nitric oxide in plants: to NO or not to. *Phytochemistry*, 54:1-4.

- Xiong, L., Zhu, J.K. (2003) Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 133:29-36.
- Yamamoto, A., Katou, S., Yoshioka, H., Doke, N., Kawakita, K. (2003) Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogens signals. *Journal of General Plant Pathology*, 69:218-229.
- Zhao, F.Y., Zhang, X.J., Li, P.H. (2006) Co-expression of the Suaeda salsa SsNHX1 and Arabidopsis AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1.*Mol Breeding*, 17:341-353.
- Zhao, G.Q., Ma, B.L., Ren, C.Z. (2007) Growth, Gas exchange, Chlorophyll Fluorescence, and Ion content of Naked Oat in response to salinity. *Crop Science*, 47:123-131.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y., Li, B., Zhang, L. (2004) Nitric Oxide Function as a Signal in Salt Resistence in the Calluses from Two Ecotypes of Reed. *Plant Physiology*, 134:849-857.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, S., Tan, M. (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscísico acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist*, 175:36-50.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Tan, M., Hu, X. (2006) Mitogen-actived protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology*, 141:475-487.
- Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Wei, Q., Zhang, W. (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na/H antiport in the tonoplasto. *Planta*, 224: 545-555.
- Zhu, D., Scandalios, J.G. (1994) Differentail accumulation of manganesesuperoxide trnascropts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiology*, 106:173-178.
- Zhu, J.K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 441-445.
- Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Lo Schiavo, F., Terzi, M. (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Letters*, 515: 75-78.