

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

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

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

Resumo - Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da aplicação foliar de H₂O₂ no crescimento e nos teores de solutos orgânicos e inorgânicos de plantas de milho desenvolvidas sob condições salinas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob condições hidropônicas. Oito dias após a semeadura, as plântulas foram pulverizadas com água destilada (controle) ou solução aquosa de H₂O₂ na concentração de 10 mM e, 48 h após o início da pulverização, foram submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM. Foram realizadas duas coletas, com 96 e 240 h do início da pulverização. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 (NaCl a 0 ou 80 mM) x 2 (H₂O₂ a 0 ou 10 mM), com cinco repetições. Os dados de cada tempo de coleta (96 h ou 240 h) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). O pré-tratamento de pulverização das plantas de milho com H₂O₂ induziu aclimação das plantas de milho ao estresse salino, revertendo parcialmente os efeitos deletérios da salinidade no crescimento. Este efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, a um maior acúmulo de proteínas solúveis, carboidratos solúveis e NO₃⁻, bem como a um menor acúmulo de íons tóxicos (Na⁺ e Cl⁻) nas folhas.

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

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

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

* Autor para correspondência

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

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

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

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

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

Introdução

A salinidade é um dos estresses abióticos que mais afeta o crescimento e a produtividade das plantas em todo o mundo (VAIDYANATHAN et al., 2003; VEERANAGAMALLAIAH et al., 2007), ocorrendo tanto nas áreas irrigadas como nas não irrigadas. A maioria das áreas afetadas pela salinidade ocorre naturalmente. Porém, uma proporção significativa de áreas cultiváveis tem se tornado salina em virtude de retiradas da vegetação e irrigações com águas salinas (MUNNS, 2005).

O milho é uma cultura considerada moderadamente sensível à salinidade, sofrendo, a partir de 1,6 dS m⁻¹, redução de 7,4% na produção de matéria seca por unidade de incremento de condutividade elétrica, embora esse efeito varie entre diferentes cultivares (MASS, 1993). É um cereal produzido em quase todos os continentes, sendo sua importância econômica caracterizada pelas diversas formas de utilização, desde o uso na alimentação animal até o uso na indústria de alta tecnologia, como na produção de filmes e embalagens biodegradáveis. Cerca de 70% da produção mundial de milho são destinadas à alimentação animal, podendo esse percentual chegar a 85% em países desenvolvidos. Em termos gerais, apenas 15% de toda a produção mundial destinam-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES et al., 2006).

O processo de aclimação a determinadas condições de estresse se constitui numa alternativa para aumentar a capacidade de sobrevivência das plantas a condições adversas. A aclimação consiste em um processo no qual a exposição prévia de um indivíduo a um determinado tipo de estresse provoca mudanças metabólicas que são responsáveis pelo aumento de sua tolerância a uma nova exposição ao estresse. Quando essa exposição prévia é feita com um estresse diferente do segundo (estresse definitivo), diz-se que essa aclimação induziu uma tolerância cruzada (NEILL et al., 2002). Dentre os processos de aclimação ao estresse salino, o do pré-tratamento das plantas com pequenas quantidades de H₂O₂ tem se mostrado promissor. Uchida et al. (2002), trabalhando com arroz e Azevedo Neto et al. (2005), com milho, observaram que o pré-tratamento das plântulas com H₂O₂ em solução nutritiva induziu aclimação das plantas à salinidade. Recentemente, Gondim et al. (2010), trabalhando com plantas de milho provenientes de sementes pré-tratadas com H₂O₂ e submetidas à salinidade e Wahid et al. (2007), com plantas de trigo também oriundas de sementes pré-tratadas com H₂O₂, observaram que o pré-tratamento conferiu tolerância à salinidade nas plantas. Contudo, não há informações se o pré-tratamento por pulverização foliar com H₂O₂, sistema mais simples, de baixo custo e de fácil utilização pelos produtores, também é capaz de induzir aclimação das plantas ao estresse salino.

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

Material e métodos

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

Após seleção e desinfestação com solução de hipoclorito de sódio a 0,7%, as sementes foram semeadas em copos plásticos (200 mL) contendo vermiculita e irrigadas diariamente com água destilada, sob condições de casa de vegetação. Decorridos cinco dias da semeadura, as plântulas foram transferidas para bandejas de plástico contendo 10 L de solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950), diluída 1:2, onde permaneceram por dois dias para aclimação. Diariamente, os níveis da solução nutritiva foram restituídos pela adição de água destilada e o pH monitorado, sendo mantido próximo a 5,5. A solução nutritiva foi trocada semanalmente.

Após o período de aclimação (oito dias após a semeadura), as plântulas foram pulverizadas com água destilada (controle) ou solução de H₂O₂ na concentração de 10 mM (contendo o detergente Tween 20 a 0,025%, a fim de quebrar a tensão superficial e facilitar a penetração). As aplicações foram realizadas às 06:30 h e repetidas após 24 h. Em seguida, as plântulas com 48 h após o início da pulverização foram submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM, sendo a adição de sal realizada de forma parcelada (40 mM por dia). Portanto, as plantas foram submetidas a quatro tratamentos: 1. pulverizadas com água destilada e crescendo em ausência de salinidade (controle/água); 2. pulverizadas com solução de H₂O₂ e crescendo em ausência de salinidade (controle/H₂O₂); 3. pulverizadas com água destilada e crescendo sob condições salinas (salino/água); 4. pulverizadas com solução de H₂O₂ e crescendo sob condições salinas (salino/H₂O₂).

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

submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

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

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

O extrato base para a determinação dos teores de proteínas solúveis e solutos orgânicos foi obtido a partir da maceração, em almofariz, de 1 g de folha fresca em nitrogênio líquido para obtenção do pó. Em seguida, adicionaram-se 4,0 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a 12.000 x g durante 15 min.

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

O extrato base para determinação dos teores de solutos inorgânicos foi obtido a partir da maceração,

em almofariz, de 0,5 g de folha fresca em nitrogênio líquido para obtenção do pó. Em seguida, adicionaram-se 5,0 mL de água desionizada. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a 3.000 x g durante 15 min.

Os teores de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) foram determinados por fotometria de chama, os de cloreto (Cl⁻) conforme Gaines et al. (1984), usando-se os reagentes Hg(SCN)₂ e Fe(NO₃)₃·9H₂O, sendo realizadas leituras de absorvância em 460 nm, utilizando-se NaCl como padrão. Os teores de NO₃⁻ foram determinados através do método do ácido salicílico (CATALDO et al., 1975) no qual se utiliza NaNO₃ como padrão e leituras de absorvância em 410 nm.

Resultados e discussão

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

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

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

* $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$; ^{ns} não significativo

diferenças significativas entre as plantas submetidas às condições controle e aquelas submetidas à salinidade previamente pulverizadas com H_2O_2 . A MST mostrou comportamento semelhante ao da MSPA. Com 240 h, o tratamento controle/ H_2O_2 apresentou-se 17% superior ao do controle/água, enquanto no salino/ H_2O_2 , houve um aumento de 74%, em relação ao tratamento salino/água (FIG. 1C).

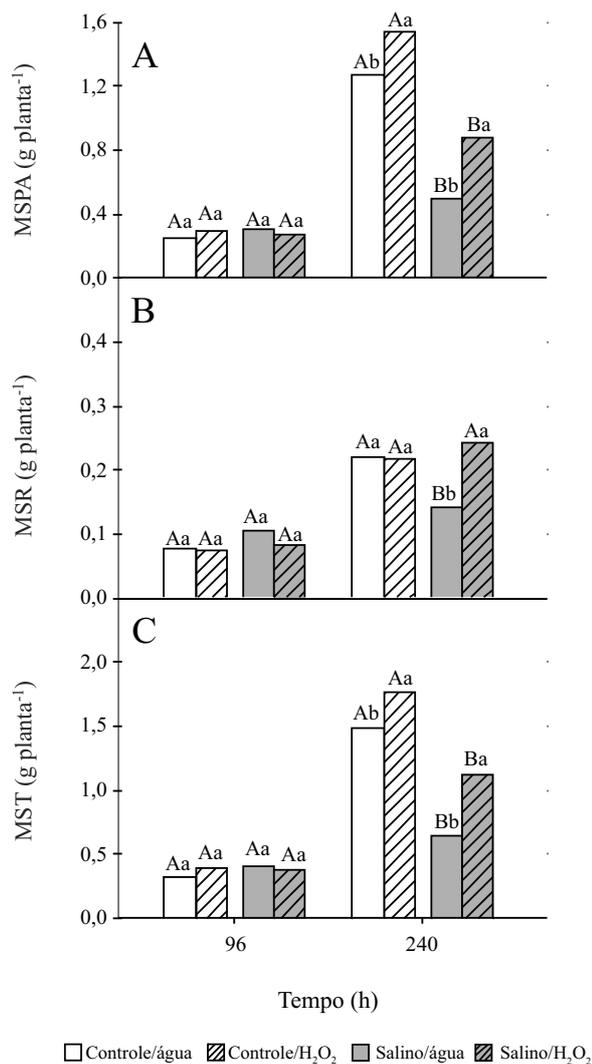


Figura 1 - Matéria seca da parte aérea (A), das raízes (B) e total (C) de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H_2O_2 (10 mM). Em um mesmo tempo de coleta, valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H_2O_2 , respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Para a área foliar (AF), não foi observada interação significativa entre os fatores salinidade e H_2O_2 . Contudo, observaram-se efeitos desses fatores isoladamente. Já para a RAF, verificou-se interação entre os fatores salinidade e H_2O_2 (TAB. 1). Comparando-se a média dos tratamentos controle com a média dos tratamentos salinos, verificou-se que a salinidade ocasionou uma redução de 70% na AF (FIG. 2A). Entretanto, a AF no tratamento controle/ H_2O_2 mostrou-se 19% superior àquela do tratamento controle/água, enquanto observou-se um aumento de 120% no tratamento salino/ H_2O_2 , em relação ao tratamento salino/água. A RAF foi reduzida pela salinidade e isto se deveu a maior redução na MST (FIG. 1C e 2B). No entanto, o tratamento salino/ H_2O_2 apresentou valores de RAF 44% superiores ao do tratamento salino/água. Estes números se devem a uma menor redução na AF do tratamento salino/ H_2O_2 em comparação ao salino/água.

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

Para os teores de proteínas solúveis, houve interação significativa entre os fatores salinidade e H_2O_2 nos dois tempos de coleta estudados (TAB. 2). A salinidade reduziu os teores de proteínas solúveis no tratamento salino/água (FIG. 3A) em 28 e 30% às 96 e 240 h, respectivamente, em relação ao tratamento controle/água. Contudo, observou-se que os teores mantiveram-se inalterados nas plantas pulverizadas com H_2O_2 e submetidas à salinidade. Em plantas submetidas a estresse salino, geralmente, verifica-se uma redução na quantidade total de proteínas (PARIDA et al., 2004). No presente trabalho, foram observadas reduções nos teores de proteínas pela salinidade somente nas plantas pulverizadas com água destilada. Portanto, a pulverização com o H_2O_2 mostrou-se eficiente.

Para os teores de carboidratos solúveis, constatou-se interação significativa entre os fatores salinidade e H_2O_2 apenas no tempo de 96 h, embora se tenha observado efeitos significativos dos fatores isoladamente no tempo de 240 h (TAB. 2). A pulverização com H_2O_2 levou a incrementos nos teores de carboidratos solúveis (FIG. 3B). Nas coletas realizadas com 96 e 240 h, o tratamento salino/ H_2O_2

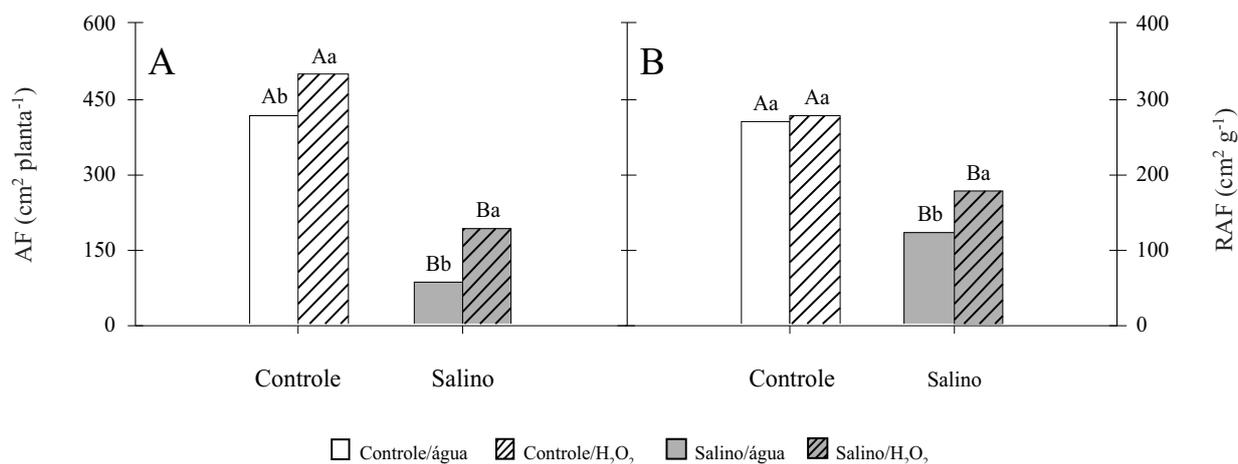


Figura 2 - Área foliar (A) e razão de área foliar (B) de plantas de milho sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM). Os dados referem-se à coleta realizada após 240 h do início da pulverização. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H₂O₂, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

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

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

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

apresentou valores 36 e 32% superiores ao tratamento salino/água, respectivamente. O tratamento salino/H₂O₂ mostrou ainda valores 30 e 40% superiores às médias dos tratamentos controle, com 96 e 240 h, respectivamente. No presente trabalho, os teores de carboidratos solúveis foram aumentados pela salinidade e pela pulverização com H₂O₂. Azevedo Neto et al. (2004), trabalhando com oito genótipos de milho, observaram que os teores de carboidratos solúveis nas folhas e raízes, de modo geral, foram reduzidos ou permaneceram inalterados pela salinidade, enquanto em um dos genótipos foi observado um aumento nesses teores pelo estresse salino nas folhas. Por outro lado, Kerepesi e Galiba (2000), trabalhando com quatro genótipos de trigo crescendo sob condições salinas, observaram que os mais tolerantes apresentaram níveis mais elevados de carboidratos solúveis.

Não houve diferença significativa nos teores de prolina entre os tratamentos, no decorrer do período experimental (TAB. 2 e FIG. 3C). Portanto, o papel da prolina como osmoprotetor ou como osmorregulador em plantas de milho pré-tratadas com água destilada ou H₂O₂ sujeitas ao estresse salino parece ter sido desprezível. Vaidyanathan et al. (2003), trabalhando com dois cultivares de arroz com tolerância diferencial à salinidade, encontraram níveis extremamente mais elevados de prolina no cultivar considerado sensível, inferindo-se, dessa forma, que a acumulação de prolina não exerce função prioritária no combate ao estresse salino, parecendo ser simplesmente uma resposta da planta ao estresse. Portanto, o papel da prolina como osmoprotetor ou como osmorregulador em plantas sujeitas ao estresse salino ainda é controverso (DEMIRAL; TÜRKAN, 2005).

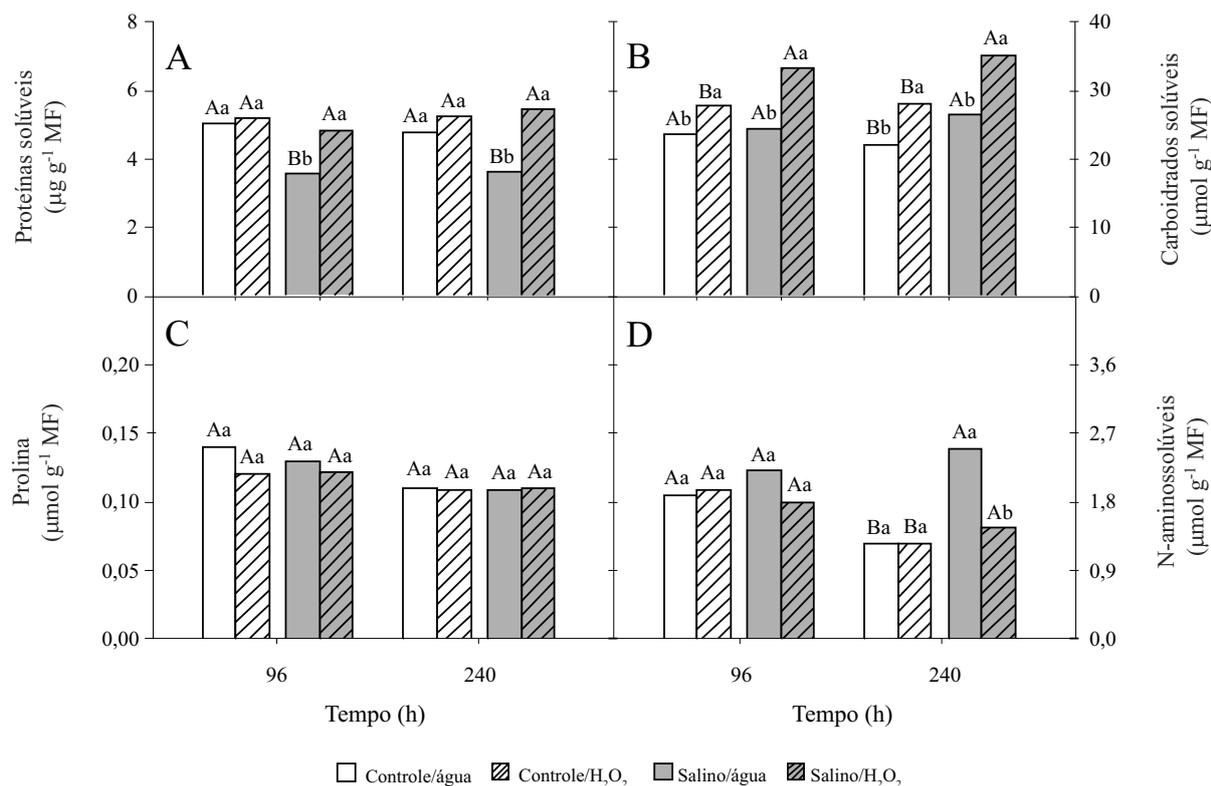


Figura 3 - Teores de proteínas solúveis (A), carboidratos solúveis (B), prolina (C) e N-aminossolúveis (D) em folhas de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM). Valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos de NaCl e H₂O₂, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

No tempo de 96 h, não houve diferença significativa nos teores de N-aminossolúveis entre os tratamentos. Porém, com 240 h, constatou-se interação entre os fatores salinidade e H₂O₂ (TAB. 2 e FIG. 3D). Os teores de N-aminossolúveis mostraram-se 88% superiores nas plantas do tratamento salino/água em comparação aos demais tratamentos. Costa et al. (2003), trabalhando com extremidades de raízes de plantas de feijão-de-corda submetidas à salinidade, não verificaram aumento significativo, em relação ao controle, nos teores de N-aminossolúveis, independente do grau de tolerância entre os sete cultivares estudados.

Dentre os solutos orgânicos analisados, os carboidratos solúveis, provavelmente, foram os que mais contribuíram para o ajustamento osmótico das plantas de milho sob condições salinas, destacando-se as plantas que receberam pulverização com H₂O₂.

Para os teores de Na⁺, observou-se interação significativa entre os fatores salinidade e H₂O₂ apenas no tempo de 240 h. Entretanto, verificou-se efeito do fator salinidade, isoladamente no tempo de 96 h. Para os teores

de Cl⁻, o comportamento foi semelhante ao observado para Na⁺ nos dois tempos de coleta, adicionando-se o efeito significativo apresentado pelo fator H₂O₂ (TAB. 3). A salinidade aumentou os teores de Na⁺ (FIG. 4A) e Cl⁻ (FIG. 4B) das plantas de milho em comparação àquelas crescendo sob condições controle. Após 96 h, a média dos tratamentos salinos apresentou valores de Na⁺ e Cl⁻ 112 e 91% maiores, respectivamente, em comparação à média dos tratamentos controle. Contudo, com 240 h, observou-se que as plantas do tratamento salino/H₂O₂ apresentaram menor acúmulo destes íons tóxicos.

As plantas do tratamento salino/água apresentaram teores de Na⁺ e Cl⁻ 39 e 52% maiores que os respectivos tratamentos salino/H₂O₂. Aumentos nos teores de Na⁺ e Cl⁻ nas folhas de plantas submetidas à salinidade também foram observados por outros autores (AZEVEDO NETO et al., 2004; COSTA et al., 2003), bem como melhoria nesses parâmetros em consequência do pré-tratamento com H₂O₂ (WAHID et al., 2007).

Com relação aos teores de K⁺, não foi observada interação significativa entre os fatores salinidade e H₂O₂

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

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

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

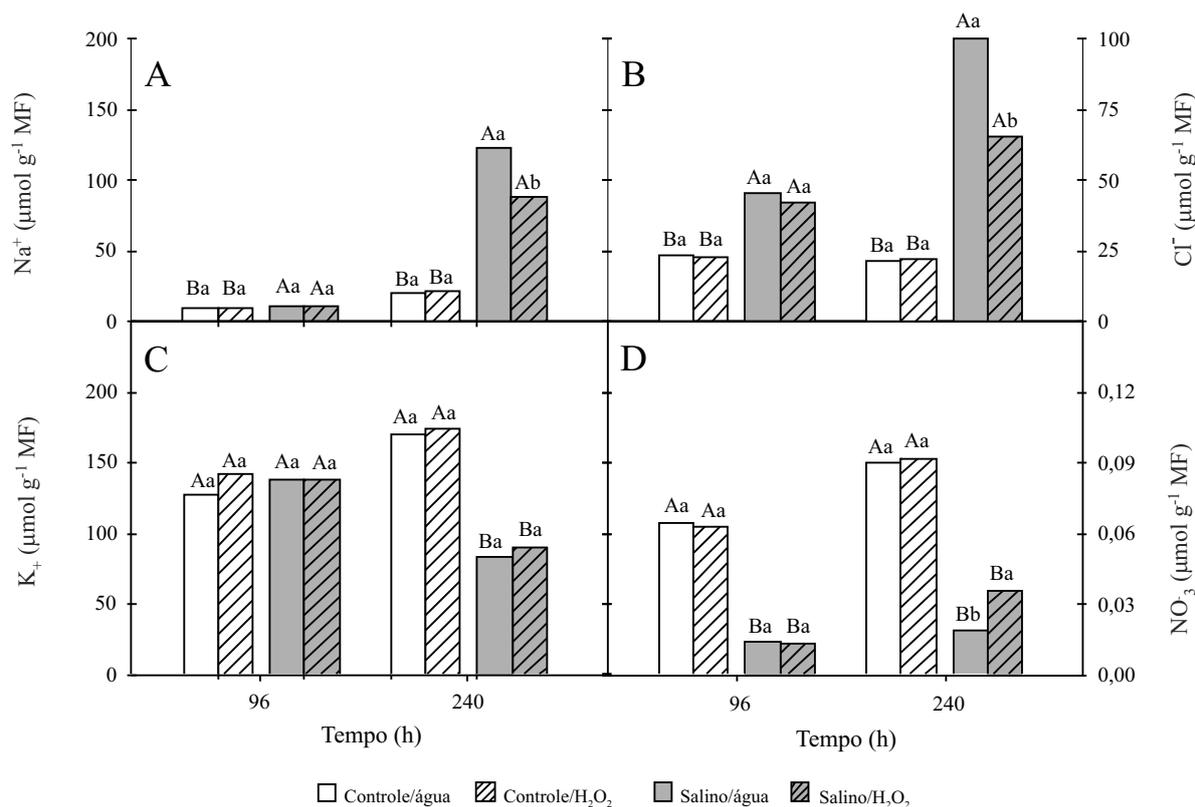


Figura 4 - Teores de Na⁺ (A), Cl⁻ (B), K⁺ (C) e NO₃⁻ (D) em folhas de plantas de milho sob condições controle ou salinas (NaCl a 80 mM) e pulverizadas com água destilada ou H₂O₂ (10 mM). Valores seguidos pela mesma letra maiúscula ou minúscula não são estatisticamente diferentes entre si para os tratamentos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

nos dois tempos de coleta. No entanto, observou-se efeito do fator salinidade no tempo de 240 h (TAB. 3). Não houve diferenças significativas nos teores de K⁺ (FIG. 4C) entre plantas pulverizadas com água destilada ou H₂O₂. Entretanto, com 240 h, observou-se que a salinidade ocasionou uma redução média de 50% nos teores de K⁺ nas folhas das plantas de milho, independente da pulverização aplicada. Em condições de estresse salino, os resultados sobre os teores de K⁺ são variados. Enquanto alguns

autores observaram aumentos (ERDEI; TALEISNIK, 1993, em milho; SILVA, 1998, em feijão-de-corda), outros observaram diminuições (AZEVEDO NETO et al., 2004, em milho; LACERDA et al., 2004, em sorgo). As diminuições nos teores de K⁺ poderiam ser atribuídas às elevadas concentrações de Na⁺ e ao antagonismo que existe entre estes dois íons, visto que o Na⁺ também pode entrar nas células radiculares por meio de canais de K⁺ de baixa e alta afinidade (APSE; BLUMWALD, 2002).

Para os teores de NO_3^- , foi observada interação entre os fatores salinidade e H_2O_2 apenas no tempo de 240 h. Para o tempo de 96 h, constatou-se apenas efeito do fator salinidade isoladamente (TAB. 3). A salinidade ocasionou redução nos teores de NO_3^- (FIG. 4D) em relação às plantas dos tratamentos controle. Após 96 h, constatou-se que a média dos tratamentos controle mostrou-se 4,6 vezes maior do que a média dos tratamentos salinos. Com 240 h, a pulverização com H_2O_2 levou a incrementos nos teores de NO_3^- , tendo o tratamento salino/ H_2O_2 se mostrado 89% superior ao tratamento salino/água. O NO_3^- é um dos elementos essenciais à planta, estando envolvido no crescimento e desenvolvimento das plantas, já que participa da constituição de muitas biomoléculas tais como proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, coenzimas, vitaminas e pigmentos (DUBEY; PESSARAKLI, 1995).

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

Conclusão

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

Agradecimentos

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

Referências

- APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 02, p. 146-150, 2002.
- AZEVEDO NETO, A. D. *et al.* Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 01, p. 31-38, 2004.
- AZEVEDO NETO, A. D. *et al.* Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 10, p. 1114-1122, 2005.
- BATES, L. S. *et al.* Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 02, p. 205-207, 1973.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 01-02, p. 248-254, 1976.
- CATALDO, D. A. *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 01, p. 71-80, 1975.
- COSTA, P. H. A. *et al.* Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 03, p. 289-297, 2003.
- DEMIRAL, T.; TÜRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, n. 03, p. 247-257, 2005.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 03, p. 350-356, 1956.
- DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plants under stressful conditions. In: PESSARAKLI, M. **Handbook of plant and crop physiology**. New York: Marcel Dekker, 1995, p. 605-625.
- ERDEI, L.; TALEISNIK, E. Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. **Physiologia Plantarum**, v. 89, n. 02, p. 381-387, 1993.
- GAINES, T. P. *et al.* Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate. **Agronomy Journal**, v. 76, n. 03, p. 371-374, 1984.
- GONDIM, F. A. *et al.* Pretreatment with H_2O_2 in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 02, p. 103-112, 2010.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-cultured method for growing plants without soil**. California: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (Circular n. 347).
- KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, v. 40, n. 02, p. 482-487, 2000.

- LACERDA, C. F. *et al.* Influência do cálcio sobre o crescimento e solutos em plântulas de sorgo estressadas com cloreto de sódio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 02, p. 289-295, 2004.
- MASS, E. V. Testing crops for salinity tolerance. In: WORKSHOP ON ADAPTATION OF PLANTS TO SOIL STRESS, Lincoln. **Proceedings**... Lincoln: INTSORMI, 1993. p. 234-247.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance. **New Phytologist**, v. 167, n. 03, p. 645-663, 2005.
- NEILL, S. *et al.* Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 05, p. 388-395, 2002.
- PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos dos Grãos do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2006. 6 p. (Circular Técnica n. 75).
- PARIDA, A. K. *et al.* Effects of salt on growth, ion accumulation photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees-Structure and Function**. v. 18, n. 02, p. 167-174, 2004.
- SILVA, J. V. **Efeitos do CaCl₂ no crescimento e acumulação de osmorreguladores em plantas de feijão-de-corda cv. Pitiúba estressadas com NaCl**. 1998. 103 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- UCHIDA, A. *et al.* Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, v. 163, n. 03, p. 515-523, 2002.
- VAIDYANATHAN, H. *et al.* Scavenging of reactive oxygen species in NaCl stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v. 165, n. 06, p. 1411-1418, 2003.
- VEERANAGAMALLAIAH, G. *et al.* Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase activity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italica* L.) with differential salt sensitivity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 02, p. 239-244, 2007.
- WAHID, A. *et al.* Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 03, p. 283-294, 2007.
- YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with ninhydrin. **The Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.