

**EFEITO DO ESTRESSE SALINO E DO ÓXIDO NÍTRICO NA
GERMINAÇÃO DO MILHO (*Zea mays*) E SUA INFLUÊNCIA NA
ATIVIDADE DE TIROSINA FOSFATASE**

VAGNER ROCHA SIMONIN DE SOUZA

ORIENTADORA: Eliane Fialho de Oliveira

**Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro
visando a obtenção de grau de Mestre em Nutrição**

Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Instituto de Nutrição Josué de Castro

Universidade Federal do Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EFEITO DO ESTRESSE SALINO E DO ÓXIDO NÍTRICO NA GERMINAÇÃO DO MILHO (*Zea mays*) E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE DE TIROSINA FOSFATASE

Dissertação submetida ao Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Nutrição.

Banca Examinadora:

Profa. Eliane Fialho de Oliveira
Profa. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ
Orientadora

Prof. Antonio Galina Filho
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica / UFRJ
Revisor

Prof. Mário Alberto Cardoso da Silva Neto
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica / UFRJ

Profa. Lucia Maria Jaeger de Carvalho
Profa. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ

Prof. Wagner Seixas da Silva
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica / UFRJ
Suplente Externo

Profa. Vera Lúcia Valente Mesquita
Profa. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ
Suplente Interno

Ficha catalográfica

Souza, Vagner Rocha Simonin

Efeito do Estresse Salino e do Óxido Nítrico na Germinação do Milho (*Zea mays*) e sua Influência na Atividade de Tirosina Fosfatase/Vagner Rocha Simonin Souza. Rio de Janeiro: UFRJ/INJC, 2007

No de folhas xvi, 101 p.

Dissertação: Mestre em Nutrição – Universidade Federal do Rio de Janeiro, INJC

1. *Zea mays* 2. tirosina fosfatase 3. germinação 4. estresse salino 5. óxido nítrico 6. Dissertação

I. Efeito do Estresse Salino e do Óxido Nítrico na Germinação Do Milho (*Zea mays*) e sua Influência na Atividade de Tirosina Fosfatase.

II. Mestre

Este trabalho foi realizado no laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos no Instituto de Nutrição, sob orientação da Professora Eliane Fialho de Oliveira, na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB-ALV) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico esta dissertação a minha orientadora, pelo seu incentivo e pela sua amizade.

Sem sua dedicação este trabalho não seria realizado

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por todas as oportunidades que colocou na minha vida, pela sua presença constante em todos os momentos

À Lili, minha orientadora, por toda sua amizade, pelo incentivo, pelas cobranças, pelos conselhos, enfim por toda a convivência nestes 5 anos de grupo. Muito obrigado por tudo!!!!

Ao meu grande amigo Marcos, por todo o incentivo dado para conclusão desta dissertação, por agüentar meus momentos de estresse e por sempre ter uma palavra amiga para as horas mais difíceis.

À minha avó, Mariana, que infelizmente não se encontra mais conosco, mas tenho certeza de que onde estiver está feliz com mais essa conquista!
Obrigado por ter sido essa pessoa tão presente na minha vida

Aos meus pais que apesar de muitas vezes não entenderem nada do que faço, sinto que se orgulham de mim.

A toda minha família e meus amigos (não citarei nomes, todos estão homenageados, de coração), pela força e por entenderem a minha ausência em alguns eventos, por causa dos milhos. Vejam, valeu à pena!!

À Raquel, mesmo não trabalhando mais com o milho, você sempre foi solícita a todas as minhas dúvidas, continuando a me orientar com muita atenção! Muito obrigado por todo seu carinho, sempre serei grato a você!

À minha irmãzinha científica Fabi, por ouvir muitas vezes minhas angústias e meus “achismos”, por estar sempre aconselhando e dividindo as alegrias e os medos! Obrigado por ter sido uma companheira e tanto nesta fase da minha vida!

À Chris, pelo convívio, pela amizade, por ser companheira em todos os momentos, por proporcionar alegria com seu sorriso, inclusive nas horas de mais ansiedade. Obrigado por toda sua força!

A todos os membros do Laboratório de Alimentos Funcionais e Sementes (LabAFS), Ana Carla, Ana Luisa, Jaqueline, Renatinha, Daniel, Paula e Dany. Muito obrigado pelo ótimo convívio com todos vocês

A meu aluno de iniciação científica, André, apesar de você ter ficado pouco tempo no grupo, muito obrigado pela ajuda nos experimentos e por me ensinar a ensinar.

Às professoras Vera Valente e Maria Lúcia e todo seu grupo de pesquisa (Carol, Tati, Elisa, Flávia, Lu e Paula), pelo convívio harmonioso no laboratório .

À EMBRAPA – Milho e Sorgo, por nos ceder gentilmente as sementes de milho.

Ao professor Masuda, por nos acolher em suas instalações, sendo sempre receptivo e solícito.

Ao professor Mário, pela sua atenção, sua acolhida em seu laboratório e principalmente pela sua colaboração tornando este projeto viável.

À professora Georgia por nos ceder gentilmente a Prolina,

À Lilian e a Paula pelo auxílio nas microscopias, e à Helô por toda sua atenção

À Denise, Paula, Lize, Maya, Angélica, enfim a todos os alunos do Laboratório do de Bioquímica de Insetos, obrigado pelo ótimo convívio.

Ao Alan Barbosa, Felipe, Alan Brito, enfim a todos os alunos do laboratório de Sinalização Celular, pelo convívio e auxílio

Aos membros do Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento, do Instituto de Biofísica, pelo uso do Criostato.

Resumo:

O milho é o cereal mais produzido no mundo, sendo base da alimentação em muitos países e pode estar sujeito a vários tipos de estresse. A alta salinidade dos solos é considerada o principal estresse abiótico, conferindo efeitos deletérios a vegetais. Muitas enzimas são moduladas em resposta ao estresse, como enzimas antioxidantes, ATPases e nitrato redutase. Em plantas, em situação de estresse, o óxido nítrico (NO) estimula o crescimento, induz a germinação, modula enzimas antioxidantes, conferindo assim adaptação ao estresse. A tirosina fosfatase é uma enzima cuja atividade está aumentada durante a germinação de plantas e está associada a processos de crescimento e diferenciação celular. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito de diferentes concentrações salinas e de diferentes doadores de NO durante a germinação do milho (*Zea mays* L.), através da medida da atividade de tirosina fosfatase. Para tal, foram utilizadas sementes de milho linhagem Pé de Boi (BR-106) cedidas pela EMBRAPA- Milho e Sorgo. Após sanitizadas, essas sementes foram embebidas por 24 h em água deionizada (controle), NaCl, KCl, NaI ou KI em concentrações que variaram de 0,02 a 1,0 M ou NaCl ou KCl 0,3 M combinados ou não com doadores de NO (SNAP 10 μ M ou NaNO₂ 100 μ M + Ácido Ascórbico 200 μ M). Posteriormente, as sementes foram germinadas em água deionizada por um período máximo de 48 h. Através dos resultados observou-se um decréscimo de 80 % no crescimento e de 90 % na atividade da tirosina fosfatase em embriões de 48 h, previamente embebidos com 1,0 M de NaCl, KCl, NaI e KI. No gel nativo de atividade, observou-se uma diminuição na intensidade da coloração após 48 h de germinação, conforme o aumento na concentração dos sais. O estudo

histoquímico mostrou um decréscimo na atividade fosfatásica no meristema apical de embriões com 24 h de germinação, os quais foram previamente, embebidos nas soluções com 0,2 M de todos os sais estudados. Quando analisou-se o perfil de fosfotirosina, observou-se diminuição da banda de 14 kDa nos embriões controle com 48 h de germinação. E a partir de 0,2 M de todos os sais estudados não foi observado este evento. O conteúdo total de prolina aumentou 2 vezes e o de açúcares solúveis 4 vezes no tempo 0 h de germinação em 1,0 M dos sais estudados, quando comparados aos embriões controle. Em relação aos doadores de NO, observamos recuperação do crescimento e da atividade da tirosina fosfatase, em 36 horas de germinação, quando os doadores foram adicionados na água de embebição das sementes submetidas ao estresse salino. A inibição da proteólise, o aumento da peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de nitrato, causados pelos sais foram revertidos a níveis próximos àqueles do controle, quando os doadores de NO foram adicionados na água de embebição das sementes após o estresse. Esses dados sugerem que as sementes de milho nesta fase de germinação não são tolerantes aos sais estudados e que doadores de NO adicionados na água de embebição são capazes de reverter os efeitos causados pelo estresse por NaCl e KCl 0,3 M. Conclui-se que a atividade de tirosina fosfatase é modulada pelo estresse salino e esta é revertida a níveis normais quando se adiciona doadores de NO.

Abstract

Maize is the cereal more produced in the world, being base of the feeding in many countries and it can be subject to some types of stress. The high salinity of soils is considered the main type of abiotic stress, able to confer deleterious effect to the vegetables. Many enzymes are modulated in reply to stress, like some antioxidant enzymes, ATPases and nitrate reductase. In plants, in stress situation, nitric oxide (NO) stimulates growth, induces germination, confers stress adaptation and modulates antioxidants enzymes, amongst others. Tyrosine phosphatase is an enzyme whose activity is increased during plant germination and is associated with growth processes and cellular differentiation. Thus, the objective of this work is to characterize the effect of different saline concentrations and NO donors during the germination of the maize (*Zea mays* L.), through the measure of tyrosine phosphatase activity. For then we use maize (*Zea mays*) seeds kindly provided by EMBRAPA. After sanitized, these seeds had been soaked by 24 h in deionized water (control) or NaCl or KCl 0.3 M added with NO donors (SNAP 10 μ M or NaNO₂ 100 μ M + Ascorbic Acid 200 μ M). Later the seeds had been germinated in deionized water for a maximum period of 48 h. In ours results we observed a decrease at 80 % in growth and 90 % on tyrosine phosphatase activity in embryos from 48 h previously soaked with 1.0 M of NaCl, KCl, KI or NaI. In native gel activity we observed a slightly stained of one band of protein when all salt concentrations were increased. The histochemical studies showed a decrease of phosphatase activity in apical meristeme of embryos at 24 h of germination previously soaked with 0.2 M of all salts studied. When we analyses the phosphoprotein profile we observed diminish of intensity of a 14 kDa phosphoprotein band from 0.2 M of

all salts were utilized. Total proline content showed an increase of 2-fold and total soluble sugars of 4-fold in 0 h of germination with 1 M of all salts, when compared with control embryos. In relation to the NO donors, we observe a growth recovery in 36 h of germination from maize embryos submitted to the saline stress (soaked with NaCl and KCl 0.3 M), followed of this fact, also occurred the recovery of the activity of tyrosine phosphatase from 36 h of germination. The proteolysis inhibition, the enhanced lipid peroxidation and reduction of nitrate levels, events caused for salt stress, had been reverted to control levels when the NO donors was added in the soaked water of the salt stressed seeds. These data suggest that the maize seeds are not tolerant to all salt studied from 0.2 M, when these are added in the soaked water and, NO donors are capable to revert the damages for NaCl or KCl 0.3 M in this phase of the germination. Also we conclude that the tyrosine phosphatase activity is modulated by all salts studied and increases when NO donor is added.

Lista de Abreviaturas:

| | | | |
|-----------------------|---|-------------------------------------|---|
| μL | Microlitros | N | Normal |
| μM | micromolar | N₂O | Óxido Nitroso |
| AA | Ácido Ascórbico | Na⁺ | Íon sódio |
| ABA | Ácido Abiscícico | Na₂NO₂ | Nitrito de Sódio |
| AMM | Alta Massa Molecular | NaCl | Cloreto de Sódio |
| ATP | Adenosina tri/fosfato | NaI | Iodeto de Sódio |
| BMM | Baixa massa molecular | NaOH | Hidróxido de Sódio |
| Ca⁺ | Íon cálcio | nm | Nanômetros |
| | | nM | nano Molar |
| cADP | Adenosina di-fosfato cíclica | NO | Óxido Nítrico |
| cGMP | Guanina mono fosfato cíclica | NOS | Óxido Nítrico sintase |
| cm | centímetros | NR | Nitrato redutase |
| CONAB | Companhia Nacional de Abastecimento | p/v | Peso por volume |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária | pH | Potencial hidrogeniônico |
| H⁺ | Íon hidrogênio | Pi | Fosfato inorgânico |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística | pNP | p-nitro-fenol |
| KCl | Cloreto de Potássio | pNPP | p-nitro-fenil-fosfato |
| KI | Iodeto de Potássio | ptn | proteína |
| M | molar | SNAP | S-Nitroso-N-acetilpenicilamina |
| MAD | Malondialdeído | SNP | Nitroprussiato de Sódio |
| MAPK | Quinases ativadas por estímulos mitogênicos | TBA | Ácido Tiobarbiturico |
| mg | miligrama | TBARS | Espécies reativas do ácido tiobarbiturico |
| min | minutos | TCA | Ácido tri-cloro acético |
| mm | milímetros | V | Volume |
| mM | Mili molar | | |

Índice

| | |
|---|-----------|
| I. Introdução | 1 |
| I.1. O Milho | 1 |
| I.2. Respostas ao estresse | 6 |
| I.3. Óxido Nítrico em plantas | 14 |
| I.4. Fosfatase em plantas | 19 |
| I.5. Justificativa | 22 |
| | |
| II. Objetivos | 25 |
| | |
| III. Materiais e Métodos | 26 |
| III.1. Materiais | 24 |
| III.2. Sementes e coleta de embriões | 24 |
| III.3. Embebição com diferentes sais | 25 |
| III.4. Embebição com diferentes doadores de NO | 25 |
| III.5. Homogenato total | 25 |
| III.6. Dosagem de proteína total | 25 |
| III.7. Medida da atividade pNPPásica ao longo da germinação | 26 |

| | |
|--|-----------|
| III.8. Conteúdo de fosfato livre | 26 |
| III.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes | 27 |
| III.10. Atividade Fosfatásica em Gel Nativo | 28 |
| III.11. Western Blotting Anti-fosfotirosina | 29 |
| III.12. Atividade <i>pNPP</i> ásica <i>in situ</i> | 30 |
| III.13. Dosagem de Nitrato | 31 |
| III.14. Determinação da Peroxidação Lipídica | 31 |
| III.15. Determinação de Prolina | 32 |
| III.16. Determinação de Açúcares Solúveis | 33 |
| III.17. Desenho experimental e análise estatística | 33 |
| IV. Resultados | 36 |
| IV.1. Embebição em diferentes sais | 36 |
| IV.2 Embebição de sementes de milho com doadores de NO (SNAP e NaNO ₂ + AA), adicionados ou não de NaCl ou KCl. | 37 |

| | |
|---|-----------|
| V. Discussão | 54 |
| VI. Conclusão | 63 |
| VII. Referências | 66 |
| VIII. Anexo | 77 |
| Manuscrito intitulado “ <i>Salt stress decrease tyrosine phosphatase activity in maize germination</i> ”, em fase final de preparação, a ser submetido para revista Journal of Plant Physiology | 78 |

I. Introdução:

I.1. O milho:

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta que pertence à família *Gramineae/Poaceae*. Os aspectos vegetativos e reprodutivos do milho podem ser modificados através da interação com os fatores ambientais, como temperatura e umidade, que afetam o controle do desenvolvimento da planta. Contudo, o resultado da seleção natural e da domesticação foi uma planta robusta e ereta, apresentando de um a quatro metros de altura, com produção anual e voltada para a produção de grãos (Magalhães *et al.*, 1995).

Acredita-se que o milho seja cultivado há pelo menos 5.000 anos, sendo assim uma das culturas mais antigas do mundo. É a mais importante planta comercial com origem nas Américas. Embora, no Brasil, cerca de 60 a 80% da produção do milho seja destinada ao consumo animal, o produtos derivados de milho, como o fubá, a partir do qual alimentos ou preparações como angu, cuscuz, polenta, curau e pamonha são feitos, constitui-se um fator importante para o consumo desse cereal em regiões com populações de baixa renda, principalmente no Nordeste do Brasil, por ser o milho, rico em carboidratos e constituindo-se muitas vezes, na principal fonte de energia para muitas pessoas que vivem em regiões semi-áridas (EMBRAPA, 2006).

Em 2001, o milho passou a ser o cereal mais produzido no mundo, superando o trigo. Esse crescimento acompanhou sua demanda para alimentação animal, isto é, enquanto que o trigo é usado basicamente para consumo humano, o milho é mais versátil, principalmente no que diz respeito à alimentação animal, aumentando o leque de aplicações desse cereal (Duarte, 2006).

Atualmente, somente cerca de 5% de produção brasileira se destina ao consumo humano e, mesmo assim, de maneira indireta, na composição de outros produtos de mesa. Isto se deve principalmente à falta de informação sobre sua composição nutricional e à ausência de uma maior divulgação de sua qualidade nutricional. A região centro-sul caracterizou-se em 2006, como a maior produtora de milho, sendo responsável por 89,9% da safra (CONAB, 2006).

O grão de milho é constituído de 70 % por carboidratos e os outros 30 % distribuídos entre proteínas, vitaminas (A e complexo B), sais minerais (ferro, fósforo, potássio, cálcio), óleo, gorduras e celulose (Cowieson, 2005).

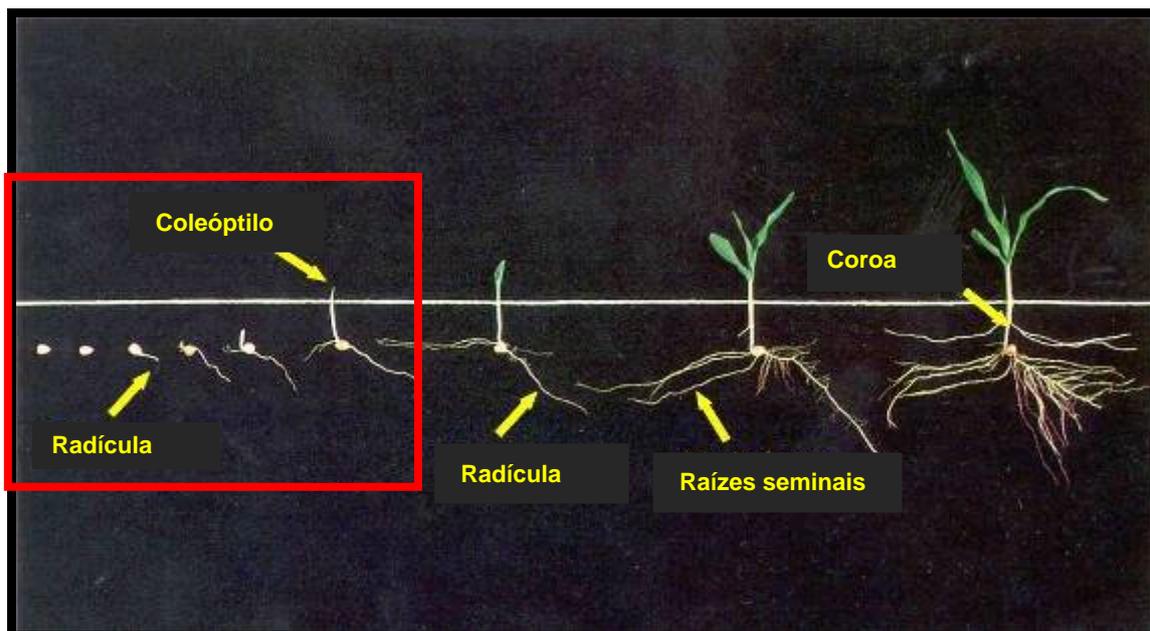
Nos Estados Unidos, o uso do milho na alimentação humana é relativamente pequeno - embora haja grande produção de cereais matinais como flocos de cereais ou *corn flakes* e xarope de milho, utilizado como adoçante. No México, o seu uso é muito importante, sendo a base da alimentação da população, pois é o ingrediente principal das tortilhas, e outros pratos da culinária mexicana. No Brasil, é a matéria-prima principal de vários pratos da culinária típica brasileira como canjica, cuscuz, polenta, angu, mingaus, cremes, entre outros como bolos, pipoca ou simplesmente milho cozido. Apesar de ser usado para fazer pães, o milho não contém o complexo protéico glúten. Isso faz com que os assados de milho sejam tolerados por indivíduos que possuem doença celíaca (EMBRAPA, 2006).

Apesar do alto percentual de estabelecimentos que consomem o grão internamente, estes representam apenas 24,93% da produção nacional de milho. Adicionalmente, no que diz respeito ao emprego de mão-de-obra, cerca de 10% das pessoas ocupadas nas lavouras temporárias e cerca de 5% dos trabalhadores do setor agrícola estão ligados à produção de milho. No setor agropecuário, a produção de milho só perde para a pecuária bovina em termos de utilização de mão-de-obra, apesar das tecnologias modernas, utilizadas na produção desse cereal, serem poupadoras de mão-de-obra (IBGE, 2006; Duarte et al., 2006).

O cultivar BR 106 tem alto alcance social, por ser adequado ao cultivo em comunidades de pequenos produtores rurais, constituindo-se em excelente alternativa para aqueles agricultores que necessitam aumentar sua produtividade com pouco investimento. Além disso, está posicionado como um líder de mercado no país, sendo o cultivar mais plantado no Brasil, uma vez que apresenta boa estabilidade de produção e adaptabilidade a todas as regiões brasileiras (Noce, 2004).

Todas as plantas de milho seguem um mesmo padrão de desenvolvimento, porém, o intervalo de tempo específico entre os estádios e o número total de folhas desenvolvidas pode variar entre cultivares diferentes, ano agrícola, data de plantio e local (Magalhães *et al.*, 1995).

Em condições normais de campo, após a semeadura, as sementes absorvem água e começam a crescer. A radícula é a primeira a se alongar, seguida pelo coleótilo, com plúmula incluída. Esse estágio, conhecido como VE, é atingido pela rápida elongação do mesocótilo, o qual empurra o coleótilo em crescimento para a superfície do solo. Em condições de temperatura e umidade do ar adequadas, a emergência ocorre 4 a 5 dias após a semeadura, porém, em condições de baixa temperatura e pouca umidade, a germinação pode ocorrer após duas ou mais semanas. Assim que a emergência ocorre e a planta expõe a extremidade do coleótilo, o mesocótilo pára de crescer (Magalhães e Durães, 2002). Na figura 1 pode-se observar com mais clareza essas etapas da germinação do milho, as quais estão assinaladas com retângulo vermelho.



Fonte: <http://web.extension.uiuc.edu/rockfordcenter/images/corn%20germination.jpg> acesso em 04/09/2007.

Figura 1: Esquema das fases de germinação do milho

* o retângulo vermelho destaca a fase em estudo da germinação do milho.

I.2. Respostas ao estresse:

As plantas estão sujeitas a vários tipos de estresse durante as diversas fases de seu ciclo de vida. Essas situações de estresse podem ser bióticas (provocadas por patógenos, parasitas, etc) ou abióticas (estímulos mecânicos, salinidade, temperatura, etc). Em todos esses casos, ocorrem cascatas de sinalização diferentes, para a adaptação da planta ou erradicação do estresse (Knight e Knight, 2001; Monsour e Salama, 2004).

Logo, ambientes que apresentam condições de estresse abiótico, principalmente seca e salinidade, constituem-se como principais fatores para a diminuição da colheita mundial. A salinidade é um problema em ascensão, afeta cerca de 20% de toda área cultivável no mundo e também metade das áreas irrigadas (Apse e Blumwald, 2002 e Sosa, *et al.*, 2005).

Cerca de 2% do território brasileiro apresenta problemas de salinidade, tais como em regiões costeiras de influência marinha (faixa de praia, dunas) e/ou de influência fluviomarina (manguezais), bem como algumas regiões do semi-árido (caatinga) no nordeste do país e no Pantanal (figura 02). São solos que apresentam elevada concentração de sais, principalmente sódio, levando a uma dificuldade para o crescimento radicular, absorção de água devido ao potencial osmótico e desbalanceamento geral entre os nutrientes (Amaral *et al.*, 1999).

Os principais solos que ocorrem nestas regiões são denominados de planossolos nátricos sálicos (EMBRAPA, 1999). Estes solos, na época chuvosa, freqüentemente, apresentam-se encharcados, sendo que no período de estiagem tornam-se muito secos, extremamente duros, aparecendo fendas entre os elementos estruturais (Brasil, 1973).

Outros tipos de solos que ocorrem nestas regiões de solos salinos são englobados em várias classes, tais como: cambissolos háplicos sálicos, gleissolos sálicos, neossolos flúvicos sálicos, vertissolos hidromórficos sálicos ou vertissolos cromados sálicos, dentre outros (EMBRAPA, 1999). Segundo Brasil (1973), esses são solos salinos que aparecem em diferentes regiões climáticas. A sua formação pode dar-se sob condições hidromórficas e podem ocorrer tanto em faixas litorâneas como continentais, sendo que nas primeiras, os sais solúveis existentes têm relação com a água do mar que os impregnam e, no segundo, são considerados como resultantes das condições climáticas, pela não lixiviação dos sais solúveis liberados ou formados pela intemperização das rochas. Estes solos são caracterizados pela presença de sais de natureza diversa, cujos conteúdos, bastante elevados, variam com as estações do ano, podendo, no período mais seco, nas regiões áridas e semi-áridas ou mesmo úmidas, apresentar eflorescência salina (cristalização de sais na superfície do solo), que aparece como resultante do acúmulo de sais transportados em ascensão capilar durante o processo de evaporação.

A salinização também ocorre pelo processo de irrigação conduzido inadequadamente. Segundo Primavesi (1996), a salinização pode ser causada por utilização de água para irrigação com altas concentrações de sais. Todos os problemas que ocorrem devido a água no solo, estão relacionados com infiltração e evaporação. Se a infiltração for maior, os solos são facilmente lixiviados, tornando-se ácidos, com facilidade, quando a evaporação predomina, há um acúmulo de sais na camada superficial, sendo que estes solos se salinizam com facilidade.

Primavesi (1996) também afirma que para um solo se tornar salino não é necessário existir água salina no subsolo, nem que haja calor muito intenso. A água doce apresenta sais na solução, mas em pequenas quantidades, possuindo menos de 0,6 mmhos de concentração de sais, principalmente Ca e Na e, em menor quantidade, Mg e K. Esta quantidade de sais equivale a no máximo 380 mg de sais dissolvidos por litro de água, ou seja, 380 g/m^3 ou, por exemplo, 0,006 M de NaCl ou 0,005 M de KCl. Se estes valores forem avaliados isoladamente, essas quantidades são quase insignificantes, levando-se em conta o efeito cumulativo no solo. Que, com o passar dos anos, pode ocasionar problemas de salinização em solos irrigados com água doce.

A alta salinidade leva ao estresse hiperiônico e hiperosmótico, causando vários danos a plantas não tolerantes, expostas a tal condição (Mahajan and Tuteja, 2005). Geralmente, esses eventos estão envolvidos com os processos de crescimento e fotossíntese, associados à alterações no metabolismo de carbono (Morsy *et al.*, 2005, Rejsková *et al.*, 2005), de nitrogênio (Debouba, *et al.*, 2006) e produção de espécies reativas de oxigênio (Morsy, *et al.*, 2005). Adicionalmente, aos efeitos oxidativos, ocorre a perda da integridade da membrana, que afeta tanto a senescência da planta quanto o crescimento e desenvolvimento (Shabala *et al.*, 2000).

Observa-se que, como postulado anteriormente por Mahajan e Tujeta, (2005), cereais como milho, arroz e cevada são naturalmente sensíveis ao estresse salino. Muitos estudos demonstram que altas concentrações de sais podem diminuir a taxa de germinação de muitas plantas, tais como cevada, eucalipto, feijão, dentre outras; possivelmente pelos efeitos osmóticos ou tóxicos (Morabito *et al.*, 1996, Villagra, 1997, Katsuhara e Shibasaka, 2000, Silveira *et al.*, 2001, Wahome *et al.*, 2001, Apse e Blumwald, 2002, Mühlhling and Läuchli, 2002; Rubio-Casal, 2003, Vicente *et al.*, 2003), porém algumas espécies, como soja, laranja e alho, vêm se mostrando resistentes a esse tipo de situação, já que estas plantas toleram doses de NaCl superiores a 0,2 M (Monsour e Salama, 2004).

Em relação ao milho, sabe-se que é cultivado em regiões cuja precipitação pluviométrica varia de 300 a 5.000 mm anuais, sendo que a quantidade de água consumida por uma planta de milho durante o seu ciclo está em torno de 600 mm (Aldrich *et al.*, 1982). Dois dias de estresse hídrico no florescimento, diminuem o rendimento em mais de 20 % enquanto que quatro a oito dias diminuem em mais de 50 % (Magalhães *et al.*, 1995).

Estudo realizado por Azevedo-Neto *et al.* (2006), revelou que em raízes e folhas de sorgo houve uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido desmutase, ascorbato peroxidase, guaicol peroxidase e glutathione redutase) e um aumento da peroxidação lipídica quando a planta foi submetida ao estresse salino. Em um cultivar tolerante ao estresse salino, foi observado um aumento da atividade destas enzimas quando comparado com a planta selvagem.

Além disso, um estudo de Li-Ping *et al.* (2006), observaram que quando a planta do milho foi exposta a seca e foram analisadas suas folhas no terceiro estágio de maturação, ocorreu uma diminuição significativa da atividade de enzimas antioxidantes e um aumento significativo da permeabilidade de membrana e da peroxidação lipídica.

Logo, a maior consequência do estresse por NaCl é a diminuição da infiltração celular de água. Em uma tentativa de prevenir esse efeito, plantas acumulam alguns metabólitos conhecidos como solutos compatíveis, que não inibem reações normais do metabolismo (Deeks *et al.*, 2002).

O acúmulo desses osmólitos, como açúcares redutores (frutose e sacarose), açúcares complexos (frutose e trealose) e metabólitos, como prolina, glicina betaína e ectoína, facilitam ajustes osmolares (Yamada *et. al.*, 2005). Além dessas funções, esses osmólitos teriam uma ação antioxidante, atuando como varredores de espécies reativas de oxigênio (Xiong *et al.*, 2002, Couée *et. al.*, 2006).

Outro evento importante nas adaptações ao estresse, mais comumente observado, seria a ativação de cascatas de cinases associadas a regulação redox na planta. Essas cinases são ativadas por estímulos mitogênicos (MAPK, *mitogen-activated-kinase*), atuando em fatores transcricionais que levam a resposta adaptativa ao estresse. Nesse modelo ocorre super-expressão de Na⁺/H⁺ ATPases, promovendo a compartimentalização do íon Na⁺ em vacúolos ou sua expulsão da célula, em uma tentativa de manter a homeostase iônica e garantir o turgor celular (Pitzschke e Hirt, 2006; Mahalingam e Fedoroff, 2003).

Outras enzimas também são moduladas quando a planta é submetida a condições de estresse. Podemos citar o aumento da expressão da ascorbato peroxidase em tabaco e *Arabidopsis*, conferindo uma adaptação ao estresse (Yamamoto, 2005).

Um efeito deletério ao crescimento da planta seria a inibição da nitrato redutase (NR) citosólica e da nitrito redutase encontradas nos plástídeos e cloroplastos (Debouba *et al.*, 2007). Quando a atividade dessas enzimas diminui ocorre uma paralisação em várias rotas metabólicas ligadas ao metabolismo de fixação de nitrogênio e, em última análise, ocorre eventos deletérios para a planta, como a redução do crescimento da raiz e da fotorrespiração. Essas enzimas também modulam o catabolismo de aminoácidos pela inibição da glutamina sintetase, glutamato sintase e, da assimilação de amônia (Debouba *et. al*, 2006). Logo, esses eventos são prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento da planta.

Em sementes de pepino, o estresse abiótico também afeta as enzimas fosfatases. Metais pesados como Hg, Pb e Zn, inibem a atividade de uma fosfatase ácida durante a germinação. O Mn, Na e Cd não promoveram efeitos significativos e para o K estimulou essa atividade em baixas concentrações, todavia em concentrações superiores a 10mM este metal foi capaz de inibir a atividade desta enzima (Tabaldi *et al.*, 2005).

Adicionalmente, observa-se um aumento na expressão de ácido abscísico, um fitohormônio envolvido na sinalização ao estresse. Nessa situação, sua principal função é manter a homeostase celular, promovendo fechamento de estômatos e causando dormência de sementes e, conseqüentemente, atraso na germinação, promovendo a germinação após a adaptação da semente ao estresse ou quando esta está em um ambiente favorável, (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Logo, a determinação desses eventos de resposta ao estresse salino é de grande importância na agricultura, visto que, ao entender-se mecanismos envolvidos com estresse, pode-se buscar melhorias no cultivo de plantas não tolerantes, como, por exemplo, o milho.

I.3. Óxido nítrico em plantas:

O óxido nítrico (NO) é uma molécula chave no metabolismo de plantas e animais (Del Rio *et al.*, 2003, Crawford e Guo, 2005, Delladone *et al.*, 2003). As funções desse gás foram descobertas, primeiramente, no metabolismo animal, sendo atribuído a ele, mecanismos importantes durante a neurotransmissão, vasodilatação, relaxamento de células musculares e imunorregulação de processos patofisiológicos, dentre outros (Beligni e Lamattina, 1999).

Em 1979, Klepper sugeriu que as plantas seriam capazes de sintetizar este gás, todavia, os estudos sobre as suas funções, principalmente, em relação ao crescimento, desenvolvimento e adaptação da planta ao estresse, foram publicados, em sua grande maioria, a partir dos anos 2000.

Logo, foram sugeridas várias vias de síntese deste gás em plantas, observan-se que esse mecanismo seria mais complexo do que em animais (Corpas *et al.*, 2004). Além das vias enzimáticas propostas, existem mecanismos não enzimáticos ligados à síntese de NO, tais como formação de NO através de carotenóides expostos à radiação UV e na presença de fitoquímicos em pH ácido (Bethke *et al.*, 2004). Todavia, já é sabido, há alguns anos, que a NR pode produzir NO e óxido nitroso (N₂O) a partir de nitrito, resultando em uma maior emissão de NO na planta (Yamasaki e Sakihama, 2000). A alta emissão de NO está ligada aos altos níveis de nitrito e a ativação da NR, este fato se dá, por exemplo, em estado de anóxia na planta (Kaiser *et al.*, 2002).

Nem sempre as plantas têm acesso ao nitrato (Raven, 2004). Logo, existem outras formas de produção de NO pelas plantas, que não seja a via da NR. Então, a produção de NO mediada pelo nitrato não se dá apenas através da NR na mitocôndria (Planchet *et al.*, 2005). Vias não enzimáticas no apoplásto, são ativadas (Bethke *et al.*, 2004) e a síntese de NO também pode ser via Ni-NO redutase (que leva o nitrito a amônio no plastídio) (Stohr e Ullrich., 2001) e, talvez, por uma hemoglobina de classe 2, a qual seu mecanismo ainda não foi totalmente elucidado (Crawford e Guo, 2005). Outra via importante, seria a mediada por arginina, cuja principal enzima responsável seria a óxido nítrico sintase (NOS) (Guo, 2002). Essas vias são mais bem visualizadas na figura 3.

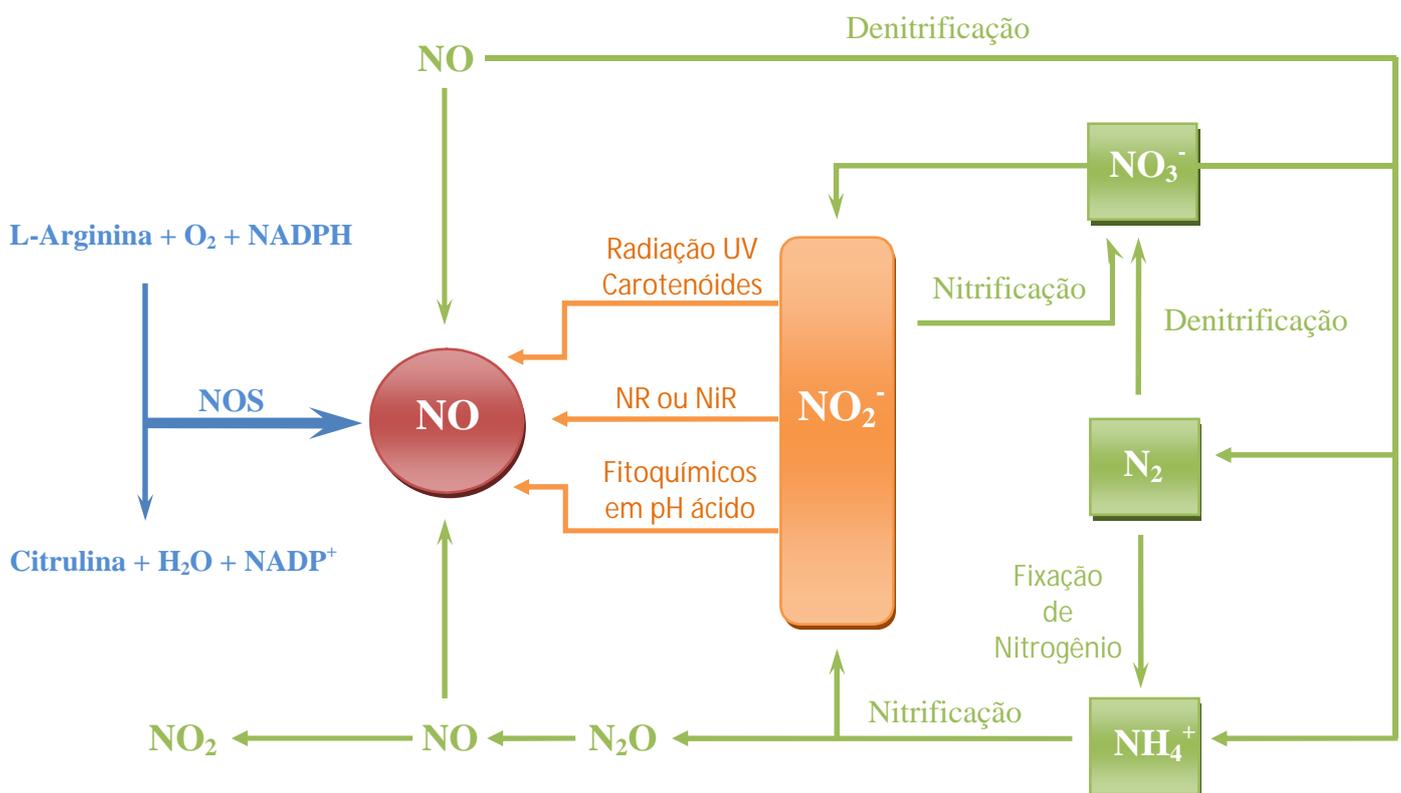


Figura 3: Vias de formação de NO em plantas (adaptado de Wojtaszek, 2000).

Alguns estudos demonstraram que a produção de NO foi diminuída quando se usou N^ω-nitro-L-Arginina (L-NNA) e N_G-monometil-L-Arginina (L-NMMA), inibidores específicos da NOS de mamíferos (Zhao *et al.*, 2004 e Del Rio *et al.*, 2004), todavia análises proteômicas revelaram que proteínas de plantas com reação cruzada com anticorpos anti-NOS de mamíferos não são relatadas como NOS (Durzan e Pedroso, 2002).

Logo, esses dados sugerem que a atividade da NOS em plantas se dá por diferentes tipos de enzimas (Crawford e Guo, 2005). Nesse mesmo estudo de Crawford e Guo, 2005 foi observado que a atividade da NOS de *Arabidopsis* é maior na mitocôndria, desempenhando importante função na detoxificação de radicais livres, uma vez que quando sua atividade aumenta, ocorre maior produção de NO, diminuição na peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e de peróxido de hidrogênio.

Com base na literatura atual ainda não se pode afirmar uma via metabólica específica para a síntese de NO. Para isto, mais estudos fazem-se, necessários para esclarecer as vias bioquímicas presentes na síntese do NO, em plantas (Crawford e Guo, 2005).

Em relações às suas funções biológicas, o NO está intimamente relacionado com a fisiologia do crescimento e do desenvolvimento (Leshem *et al.*, 1998), com a regulação da defesa contra patógenos (Durner *et al* 1999), além da indução da apoptose (Neill *et al*, 2003) e interação com espécies reativas de oxigênio (ROS) (Romero-Puertas e Delledone, 2003). Durante a germinação de algumas plantas, como, por exemplo, da beterraba, o uso de SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) e SNP (nitroprussiato de sódio), doadores clássicos de NO, favorece a reversão dos efeitos ocasionados pelo estresse salino (Kopyra e Gwózd, 2003).

Alguns compostos químicos sintéticos são capazes de liberar NO, continuamente, em um determinado período de tempo. Dentre os doadores de NO mais utilizados, encontram-se os nitratos e nitritos orgânicos e, derivados de furaxanos. Esses doadores requerem tióis como cofatores para geração de NO. Primeiramente, esse gás é transferido para o tiol, liberando um composto chamado S-nitroso-tiol. Esse derivado de tióis será o doador de NO. A reação biológica dos S-nitro-tióis é, em muitos casos, similar a reação do NO. Todavia, o uso deste nitrotióis seria uma desvantagem, já que possuem uma baixa estabilidade quando utilizados por longo tempo. Dentre esses doadores de NO, o SNAP oferece uma alta estabilidade, sendo a melhor escolha para uso contínuo (http://www.merckbiosciences.co.uk/html/cbc/nitric_oxide_donors_precursors.htm#overview. Acessado em 05/09/2007)

A geração e emissão de NO é um eficiente mecanismo para dissipar radicais livres (Del Rio *et al.*, 2004), ativando enzimas antioxidantes (Murgia *et al.*, 2004) e, também, indução de cascata de cinases, como MAPKs, levando à expressão de vários genes associados à tolerância ao estresse salino (Knight e Knight, 2001, Capone *et al.*, 2004). Além disso, o ataque por patógenos induz a atividade da NOS em tabaco e *Arabidopsis thaliana* (Wendehenne *et al.*, 2003).

No quadro 1 pode-se observar um resumo das atividades biológicas do NO em plantas.

| Tecido ou Órgão | Ação Fisiológica | Espécies | Concentração ótima (M) |
|-----------------|---|--|------------------------|
| Sementes | Indução da germinação | Paulownia-Real (<i>Paulownia tomentosa</i>), <i>Emmenanthe penduliflora</i> | 10^{-6} |
| Raízes | Inibição da respiração após a embebição | Soja | 10^{-6} |
| | Inibição da apoptose no aleuroma | Cevada | 10^{-6} |
| | Elongamento | Milho | 10^{-10} |
| | Indução da formação de raízes laterais | Pepino | $10^{-9} - 10^{-5}$ |
| Tubérculos | Tuberização | Batata | 10^{-6} |
| Hipocótilo | Inibição do alongamento por influência de baixa luminosidade | Alface e <i>Arabidopsis thaliana</i> | 10^{-6} |
| Caule | Inibição do alongamento do internódulo por influência de baixa luminosidade | Batata | 10^{-6} |
| Folhas | Indução da de-etiolação | Cevada | 10^{-6} |
| | Diminuição da senescência | Ervilha | 5×10^{-6} |
| | Fechamento de estômatos | Fava (<i>Vicia faba</i>) | 10^{-6} |
| | Expansão das folhas | Ervilha | 5×10^{-6} |
| | Indução de respostas de defesa | <i>Arabidopsis thaliana</i> e tabaco | 2×10^{-6} |
| | Inibição da morte celular | Batata | 10^{-6} |

Fonte: Beligni e Lamattina, 2001

Quadro 1: Resumo das diferentes atividades biológicas do NO em plantas.

1.4. Fosfatases em plantas:

A fosforilação e desfosforilação protéica regulam numerosos processos e são catalisadas por proteínas cinases e fosfatases, respectivamente. Essas enzimas são classificadas em dois grupos baseados na especificidade do substrato: serina / treonina ou tirosina quinases ou fosfatases. A primeira atua em resíduos de serina e treonina, enquanto que a segunda atua em resíduos de tirosina (Luan, 1998, Barizza *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2002).

Salvi *et al.* (2005) relataram que cerca de 30% das proteínas celulares estão fosforiladas, ou seja, possuem fosfato covalentemente ligado. O estado de fosforilação / desfosforilação de uma molécula, pode influenciar na atividade enzimática, localização subcelular, capacidade de ligação com substratos, estabilidade, cascatas de sinalização, dentre outros mecanismos (Cohen, 2000).

A fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas intracelulares é um importante mecanismo regulatório de crescimento celular, apoptose, proliferação e diferenciação (Zhang *et al.*, 2002, Senna, 2003).

Nesse contexto, proteínas fosfatases são enzimas capazes de remover grupamentos fosfato da cadeia lateral de fosfoaminoácidos, podendo ser classificadas em fosfatases ácidas ou alcalinas, de acordo com a sua faixa de atividade ótima de pH, além da classificação de substrato, citada anteriormente (Rodríguez-Zapata e Hernández-Sotomayor, 1998, Luan, 1998).

As fosfatases ácidas estão amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em mamíferos, principalmente nos tecidos e nos fluidos, plantas e microrganismos (Prazeres *et al.*, 2003). Em plantas, essas enzimas são encontradas geralmente em raízes (Penheiter *et al.*, 1997 e Zhang *et al.*, 2000), bulbos (Guo e Presacreta, 1997, Shinamo *et al.*, 2001), tubérculos (Gellatly *et al.*, 1994), sementes (Biswas e Cundiff, 1991, Ferreira *et al.*, 1998, Granjeiro *et al.*, 1999, Senna, 2003, Senna *et al.*, 2006) e caules (Staswick *et al.*, 1994, Veljanovski *et al.*, 2006). Essas enzimas vêm sendo descritas como presentes durante a germinação de sementes em: escutelo de milho (Rossi *et al.*, 1981), algodão (Bhargava e Sachar, 1992), tremoços (Zheng e Duranti, 1995), soja (Prazeres *et al.*, 2003), milho (Miernyk, 1992, Senna, 2003, Senna *et al.*, 2006), entre outras. Sugere-se a participação desta classe de enzimas na mobilização de reservas de fosfato, mecanismo essencial para o desenvolvimento da planta (Zheng e Duranti, 1995, Biswas *et al.*, 1996, Luan, 1998).

Outra fosfatase importante para o desenvolvimento da semente, seria a fitase. Esta enzima específica possui alta afinidade pelo ácido fítico, considerado a maior reserva de fosfato inorgânico da planta, hidrolisando este a inositol fosfato e, finalmente, a inositol (Tijskens *et al.*, 2001). Contudo, esta enzima possui também afinidade ao pNPP, um substrato sintético para fosfatases, o que pode levar a uma dúvida em relação às fosfatases não específicas.

Logo, em um recente estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi identificada uma fosfatase ácida capaz de desfosforilar resíduos de tirosina em embriões de milho durante o processo de germinação. Essa enzima demonstrou alta afinidade por *p*NPP e fosfotirosina e uma baixa afinidade pelo ácido fítico. Foi observado também, que fortemente foi inibida pelo molibdato de amônio e vanadato de sódio (clássicos inibidores de proteína-fosfotirosinas fosfatases) e pouco inibido por ácido ocaídico (inibidor clássico de proteínas serina/treonina fosfatases) (Senna, 2006).

Proteínas fosfatases estão ligadas às vias enzimáticas de tolerância ao estresse. Por exemplo, serinas/treoninas fosfatases possuem uma interação negativa com canais iônicos, isto é, quando sua atividade está diminuída, esses canais estão superexpressos (Luan, 1998). Além disso, uma enzima chamada ABI fosfatase, com característica de serina/treonina fosfatase, dependente de magnésio, é uma enzima chave na interação do ABA com os canais de potássio, aumentando o efluxo de potássio para o meio extracelular e fechamento de estômatos, visando manter a homeostase hídrica da planta (Himmelbach, *et al*, 2003).

1.5 Justificativa

Sendo assim, esta dissertação visa correlacionar a atividade da tirosina fosfatase com o estresse salino durante o processo de germinação do milho. Vários estudos sobre estresse salino utilizam o NaCl, porém outros sais, como KCl e sulfitos também são utilizados. A concentração utilizada desses sais é, em média 0,2 M, porém encontramos variações que chegam a 1,0 M. Sendo assim, o estudo da influência de diferentes concentrações de sais durante a germinação do milho torna-se importante e necessária.

Estudos do estresse salino em milho e da recuperação do crescimento de sementes estressadas, a partir da adição de doadores de NO são de grande interesse, uma vez que esse cereal é consumido amplamente no Brasil, principalmente no Nordeste, onde os solos são áridos ou semi-áridos. Portanto, esse estudo visa obter informações bioquímicas que permitam aumentar a produção desse grão, através da indução do processo germinativo prejudicado pelo estresse salino, via sinalização por NO.

II. Objetivos:

II.1. Objetivo geral:

Caracterizar o efeito de diferentes concentrações salinas e de doadores de NO durante a germinação do milho (*Zea mays L.*), através da medida da atividade de tirosina fosfatase.

II.2. Objetivos específicos:

Analisar o efeito de diferentes concentrações de NaCl, KCl, NaI e KI em embriões de milho através:

1. do padrão de crescimento das sementes,
2. do conteúdo de fosfato, proteína total e perfil protéico,
3. da atividade de tirosina fosfatase,
4. do efeito dos doadores de NO sobre o crescimento e a atividade de tirosina fosfatase,
5. do perfil histológico associado a atividade fosfatásica *in situ*,
6. do perfil de fosfotirosina nos embriões de milho,
7. da atividade fosfatásica em gel nativo,
8. do grau de peroxidação lipídica e
9. do conteúdo de nitrato e nitrito.

III. Material e Métodos:

III.1 Material

Os padrões de peso molecular para gel de poliacrilamida, na presença de SDS e TEMED, foram obtidos da firma Bioagency. Tris, glicina, acrilamida, obtidos da VETEC, p-NPP, Fast Blue BB e α -naftil fosfato foram obtidos da firma SIGMA FINE CHEMICALS (St. Louis, MO,USA). SNAP foi obtido da CALBIOCHEM (L. Jolla, CA, USA). Anticorpo policlonal contra fosfotirosina foi proveniente da Santa Cruz Biotechnology. Etanol e metanol da firma MERCK. Revelador para o western blotting BT / BCIP obtido da firma Promega. Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

III.2. Sementes e coleta de embriões

As sementes de milho (*Zea mays L.*) linhagem Pé de Boi (BR-106), fornecidos pela EMBRAPA – Milho e Sorgo, são lavadas com água sanitária, até que todo o fungicida fosse retirado e, a seguir foram enxaguados em água corrente (Senna, 2003). Em seguida, foram submetidas ao processo de embebição, que consistem na imersão das sementes em água deionizada (controle) ou em soluções com diferentes concentrações de sais, combinados ou não com doadores de NO, por um período de 24 horas. Após o período de embebição, as sementes foram colocadas para germinar em um recipiente forrado com algodão umedecido em água deionizada, na ausência de luz por um período máximo de 48 horas. Em intervalos de tempo determinados (0, 12, 24, 36 e 48 horas de germinação), cinco embriões foram coletados a cada intervalo de tempo com auxílio de pinça, medidos com auxílio de uma régua milimetrada e congelados em freezer à -18 °C (Senna, 2003).

III.3. Embebição com diferentes sais

As sementes foram embebidas em concentrações crescentes (0,02 0,2, 0,5 ou 1,0 M) de NaCl, KCl, NaI ou KI, e posteriormente, colocadas para germinar segundo item 3.2 em água deionizada por um período máximo de 48h.

III.4. Embebição com diferentes doadores de NO

As sementes foram embebidas em soluções com SNAP 10 μ M ou NaNO₂ 100 μ M + AA 200 μ M combinadas ou não com KCl 0,3M ou NaCl 0,3 M, por 24 horas. Após o processo de embebição, as sementes foram colocadas para germinar, segundo o item III.2, em água deionizada por um período máximo de 48 horas.

III.5. Homogenato Total

Os embriões coletados nos diferentes horários previamente descritos foram descongelados e homogeneizados em tubos tipo eppendorfs, com auxílio de um pistilo de vinil, em 1 ml de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Posteriormente, foram centrifugados à temperatura ambiente por 5 minutos, à 12000 g, em centrífuga apropriada para uso de Eppendorfs. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e utilizado para os ensaios experimentais.

III.6. Dosagem de proteína total citosólica

As dosagens de proteína total foram realizadas seguindo-se o protocolo descrito por Bradford (1976) utilizando albumina bovina 0,1 g % como padrão. Este método é baseado na interação entre o corante Comassie Brilliant Blue G-250 e as proteínas que apresentam aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A reação é lida espectrofotometricamente a 595 nm.

III.7. Medida da atividade pNPPásica ao longo da germinação

Os ensaios foram realizados à 37 °C por 60 minutos utilizando o tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 na presença de 2 mM de pNPP. Após 60 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 1:10 volumes de NaOH a 1N e a placa de ELISA submetida a leitura, no leitor Thermomax a 405 nm. A atividade enzimática foi expressa como quantidade de pNP liberado / mg ptn / min, utilizando o coeficiente de extinção molar do íon p-nitrofenolato a 1,75 μM / cm (Senna, 2006).

III.8. Conteúdo de fosfato livre

O conteúdo de fosfato foi determinado pela técnica descrita por Fiske Subarrow (1925) que quantifica fosfato livre em uma reação com molibdato em meio ácido. Utiliza-se uma curva padrão de fosfato para a quantificação. Os resultados foram expressos em nmols e de Pi / mg ptn.

III.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

Cinquenta µg da proteína total foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% na presença de SDS (Laemmli1970). O gel de corrida em condições desnaturantes continha Tris-HCl 375 mM, SDS 0,1 g%, acrilamida 9,7 g%, bisacrilamida 0,3 g %, persulfato de amônio 0,033 g%, TEMED 0,055 % (v/v), pH 8,8. O gel de empacotamento continha Tris-HCl 83 mM, SDS 0,07 g%, acrilamida 3,2 g %, bisacrilamida 0,09 g %, persulfato de amônio 0,073 g %, TEMED 0,123 % (v/v), pH 6,8. O tampão de corrida continha Tris-HCl 24,7 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 g %, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 10 % (v/v), azul de bromofenol a 0,001 g %, SDS a 2 g %, β-mercaptoetanol 10%. Os padrões de massa molecular utilizados foram: miosina (204 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). Após as corridas, utilizando corrente constante de 15 mA, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R 0,03% (p/v), metanol 46% (v/v) e ácido acético 9% (v/v) por 20 a 30 minutos e descorados com uma solução de metanol a 5% (v/v) e ácido acético a 7,5% (v/v).

III.10. Atividade fosfatásica em gel gativo

Cinquenta µg de proteína total das amostras de embrião de milho embebidos com 0,02M, 0,2M ou 1M de diferentes sais, assim como a amostra controle no tempo de zero e 48h de germinação, foram submetidos á eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% na ausência de SDS (Laemmli, 1970). O gel de corrida em condições não desnaturantes continha Tris-HCl 375 mM, acrilamida 9,7 g%, bisacrilamida 0,3 g%, persulfato de amônio 0,033 g%, TEMED 0,055 % (v/v), pH 8,8. O gel de empacotamento continha Tris-HCl 83 mM, acrilamida 3,2 g%, bisacrilamida 0,09 g%, persulfato de amônio 0,073 g%, TEMED 0,123 % (v/v), pH 6,8. O tampão de corrida continha Tris-HCl 24,7 mM, glicina 190 mM, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, glicerol a 10% (v/v), azul de bromofenol a 0,1 g% e sacarose a 15 g%. Após as corridas, utilizando corrente constante de 15 mA, os géis foram incubados por 60 minutos a 37 °C em três condições diferentes: (1) em tampão 0.1 M Tris-HCl pH 6,0 e 1mg/ml de Fast Blue BB, (2) tampão 0,1 M Tris-HCl pH 6,0 e 1mg/ml de Fast Blue BB, a-naftil fosfato a 0,01M, (3) tampão 0,1 M Tris-HCl pH 6,0 e 1mg/ml de Fast Blue BB, a-naftil fosfato a 0,01M e coquetel de inibidores de fosfatases contendo 0,1 mM molibdato de amônio, 0,1 mM vanadato de sódio. Após o tempo de reação, os géis foram lavados com tampão 0,1 M Tris-HCl pH 6,0 e fotografados em câmera digital Sony 7.2M Pixel.

III.11. Western blotting anti-fosfotirosina

Após o SDS-PAGE (10%), as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. A eletrotransferência foi realizada em tampão Tris-glicina 25 mM e metanol a 20 % (v/v), pH 8,3 a 180-200 mA, por 90 minutos a 4 °C (Towbin *et al.*, 1979) utilizando-se o sistema de transferência da Bio-Rad. A eficiência da transferência foi monitorada corando-se a membrana com vermelho de Ponceau a 0.5% (p/v) em TCA a 10% (p/v) por 10 minutos. Posteriormente, a membrana foi descorada por lavagem com Tris-HCl a 0,01 M, pH 7,6 contendo 0,15 M de NaCl (TBS). A membrana totalmente descorada do Ponceau foi, então, bloqueada com Tris-HCl 0,01 M, pH 7,6 contendo 0,15 M de NaCl, 5 % de albumina sérica bovina fração V (Sigma) e 0,1% de Tween 20 (TBS-Tween-Albumina) por 18 horas a 4 °C. Após 18 horas, o tampão de bloqueio foi, desprezado e a membrana incubada com anticorpo policlonal para fosfotirosina numa diluição de 1:1000 por 2 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada por 3 vezes com TBS-Tween-Albumina e incubada por 1 hora à temperatura ambiente com anti-IgG conjugada com fosfatase alcalina, por 5 minutos com TBS-Tween-Albumina, duas vezes com TBS-Tween e uma vez com TBS. Por fim, o complexo antígeno-anticorpo foi revelado com NBT / BCIP (Wersten Blue – Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase – Promega Corporation)

III.12. Atividade pNPPásica *in situ*

Os estudos histoquímicos do conteúdo citoplasmático do embrião em 24 horas de germinação foram realizados em cortes, a fresco, nos embriões das sementes embebidas com 0,02M, 0,2M, 0,5M e 1M de NaCl, KCl, NaI e KI. As amostras foram montadas em Tissue – Tek (O.C.T. Compound) formando um bloco. Os cortes foram realizados no criostato (IEC CTF Microtomo- Cryostat) à temperatura de -30 °C, em secções entre 12-16 µm de espessura. Para a localização da atividade fosfatásica foi utilizado o protocolo descrito por Bhargava e Sachar, (1987) para atividade em gel de poli-acrilamida. Os cortes foram incubados por 60 minutos a 37 °C em três condições diferentes: (1) em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 6,0 e 1mg/ml de Fast Blue BB, (2) tampão 0,1 M Tris-HCl pH 6,0 e 1mg/ml de Fast Blue BB, 0,1M α-naftil fosfato, (3) tampão 0,1 M Tris-HCl pH 6,0 e 1mg/ml de Fast Blue BB, 0,1M α-naftil fosfato e em coquetel de inibidores de fosfatases contendo molibdato de amônio a 0,1 mM, e vanadato de sódio a 0,1 mM. Após o tempo de reação, as lâminas foram lavadas com tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 6,0 e, em seguida, fotografadas com uma câmera acoplada a um microscópio óptico com um aumento de quatro vezes.

III.13. Dosagem de nitrato

A dosagem de nitrato endógeno foi realizada utilizando-se o kit de análise fluorimétrica de nitrato e nitrito da Calbiochem (Nitrate/Nitrite Fluorimetric Assay Kit), onde 30 μ L de homogenato total proveniente dos diferentes tempos de coleta dos embriões, das germinações com os diferentes tipos de sais foram adicionados a 60 μ L do tampão AB que consiste em tampão fosfato de potássio concentrado. Na ausência de luz, foram adicionados 10 μ L de DAF e após 10 minutos, 20 μ L de NaOH e a amostra teve seu volume completado para 1 mL com adição de água deionizada MiliQ. Posteriormente, as amostras foram lidas em fluorímetro utilizando a leitura de excitação a 365 nm e a de emissão a 450 nm. Para a medida dos resultados foi construída uma curva padrão de nitrato. Os resultados foram expressos em μ M.

III.14. Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela medida da formação de malondialdeído (MDA) utilizando-se o ácido tiobarbitúico (TBA). Para a extração do MDA, 0,1g de cada embrião, coletado nos tempos 0, 24 e 48h de germinação com diferentes sais, adicionados ou não e doadores de NO, foram homogeneizados em 0,5 mL de ácido tricloroacético a 0,1 % (TCA). O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10.000 g. Adicionou-se 0,2 mL dessa alíquota em 0,8ml de uma solução contendo 20 % de TCA e 0,5% de TBA. Essa mistura foi então, aquecida a 95 °C por 30 min e resfriada rapidamente, em banho de gelo. Após 5 minutos, essa mistura foi centrifugada por 15 min, a 10.000 g e a absorbância do sobrenadante é medida a 532 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM/cm de acordo com Demiral e Türkan, (2004).

III.15. Determinação de prolina

A determinação de prolina foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Battes *et al.*, 1973. Cem miligramas de embrião das sementes de milho embebidas com NaCl, KCl, NaI ou KI, nas concentrações de 0,02M, 0,2M, 0,5M e 1M nos tempos 0h, 24h e 48h de germinação foram homogeneizados em 1,5 mL de tampão de extração (Ácido Sulfossalicílico a 5%), e centrifugados por 10 min a 12000 g.

Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi retirado e adicionado a uma solução de ácido acético e ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina em 30ml de ácido acético glacial e 20 ml de ácido fosfórico 6M) 1:1 (v/v). Sendo incubada por 1h em banho-maria a 100 °C, sob agitação. Após esse tempo a reação foi paralisada em banho de gelo.

A fase orgânica foi extraída com adição de 1 mL de tolueno ao meio de reação a temperatura ambiente. Após a extração, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 520 nm. Foi construída uma curva padrão com 1 mg/ml de prolina. Os resultados foram expressos em nmols de prolina / mg de peso fresco de embrião.

III.16. Determinação de açúcares solúveis

Para a extração dos açúcares solúveis foram utilizados 100mg de embrião das sementes embebidas em NaCl, KCl, NaI ou KI, nas concentrações de 0,02M, 0,2M, 0,5M ou 1M nos tempos de 0h, 24h e 48h de germinação, homogeneizados em tampão de extração (Ácido Acético Glacial:Metanol:Água 1:4:5 v/v/v) e centrifugados por 10 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta automática e reservado. O precipitado foi ressuspendido com 1 mL de tampão de extração, citado anteriormente, e centrifugado por mais 5 min. O sobrenadante foi retirado e agrupado com o sobrenadante previamente reservado.

Posteriormente à essa extração, 500 μ L do extrato foram adicionados a uma solução contendo fenol 5 % e ácido acético glacial (1:5 v/v). A reação foi aquecida em banho-maria a 100 °C por 20 min. E paralisada em banho de gelo por 5 minutos. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 490 nm a temperatura ambiente. Foi utilizado como padrão glicose 0,1 mg/ml. Os resultados foram expressos em mmols de açúcares solúveis/ mg de peso fresco da amostra (Dubois et al., 1956).

III.17. Desenho experimental e análise estatística

Os experimentos foram independentes, e realizados em duplicata e repetidos três vezes cada. Todos os dados foram analisados por one-way ANOVA e teste de Tuckey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes. Para análise estatística foi utilizado o Programa GraphPad Prism for Windows versão 7.0.

IV. Resultados:

IV.1. Embebição em diferentes sais:

Sementes de milho embebidas com concentrações crescentes de NaCl, KCl, NaI ou KI, revelaram um decréscimo de 80 % no crescimento e 90 % na atividade de tirosina fosfatase em embriões de 48 h, previamente, embebidos com 1,0 M dos sais. No gel nativo para atividade, observou-se uma diminuição na intensidade de coloração no tempo de 48 h de germinação, conforme o aumento na concentração dos sais. O estudo histoquímico mostrou um decréscimo na atividade fosfatásica no meristema apical de embriões com 24 h de germinação, previamente, embebidos com 0,2 M de todos os sais estudados. Adicionalmente, o perfil de fosfotirosina no tempo de 48 h de germinação, revelou a diminuição da intensidade da banda de 14 kDa nos embriões controle (sem sal) e, a partir de 0,2 M, de todos os sais estudados, este evento não foi observado. O conteúdo total de prolina aumentou 2 vezes e o de açúcares solúveis 4 vezes no tempo zero h de germinação com as concentrações de 1,0 M dos sais adicionados, quando comparados com embriões controle.

No Anexo 1 (p.77), foi apresentado um detalhamento do experimento.

IV.2. Embebição de sementes de milho com doadores de NO, adicionados ou não de NaCl ou KCl.

IV.2.1. Índice de crescimento dos embriões x doadores de NO.

A adição de doadores de NO na água de embebição em associação com sais de sódio e de potássio, promoveu a retomada do crescimento do embrião do milho. Observou-se que a partir de 36 horas de germinação, houve recuperação significativa (quando $p < 0,05$) do crescimento independentemente do doador de NO utilizado. A recuperação do crescimento do embrião estressado com ambos os sais e ambos os doadores de NO alcançou níveis em torno de 50% do tamanho do embrião germinado na ausência de sal (controle). A utilização somente do doador de NO, isoladamente na água de embebição, o qual definimos como controle, não promoveu nenhuma alteração significativa (quando $p < 0,05$) no perfil de crescimento no embrião do milho, quando comparado com o crescimento do embrião embebido, previamente, em água deionizada (**Figuras 4 e 5**).

Todavia, quando adicionamos apenas 200 μ M de ácido ascórbico ou 100 μ M de nitrato de sódio, isoladamente, não houve diferença significativa na recuperação de crescimento (**Figura 6**).

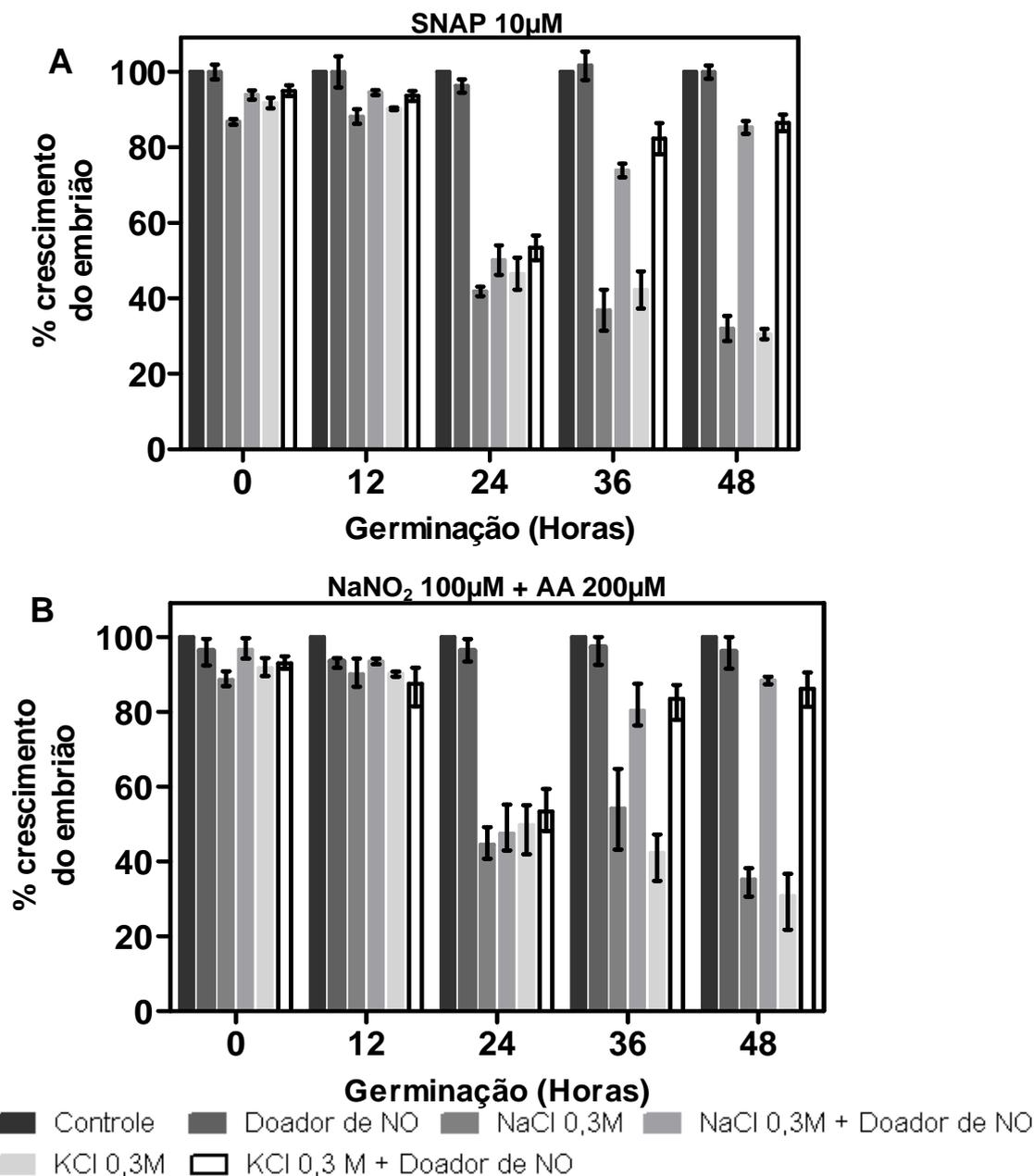


Figura 4: Índice de crescimento dos embriões de sementes de milho embebidas com SNAP 10µM ou NaNO₂ 100µM + AA 200µM, adicionados ou não de NaCl ou KCl a 0,3M.

As sementes de milho foram embebidas com doadores de NO (SNAP 10µM (A) ou nitrito de sódio 100µM e ácido ascórbico 200µM (B)) combinados ou não com de NaCl ou KCl a 0,3M ou com água deionizada (controle). Após 24 horas de embebição, as sementes foram germinadas durante 48 horas em água deionizada. Cinco embriões foram retirados em diferentes tempos de germinação (0,12, 24, 36 e 48 h) e medidos com régua milimetrada. Os resultados foram expressos em porcentagem de crescimento do do embrião em relação ao controle (considerando índice de crescimento de 100%).

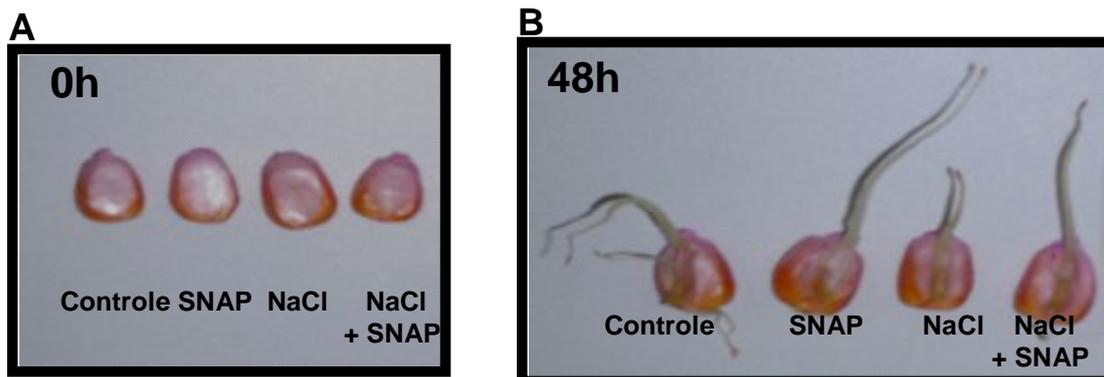
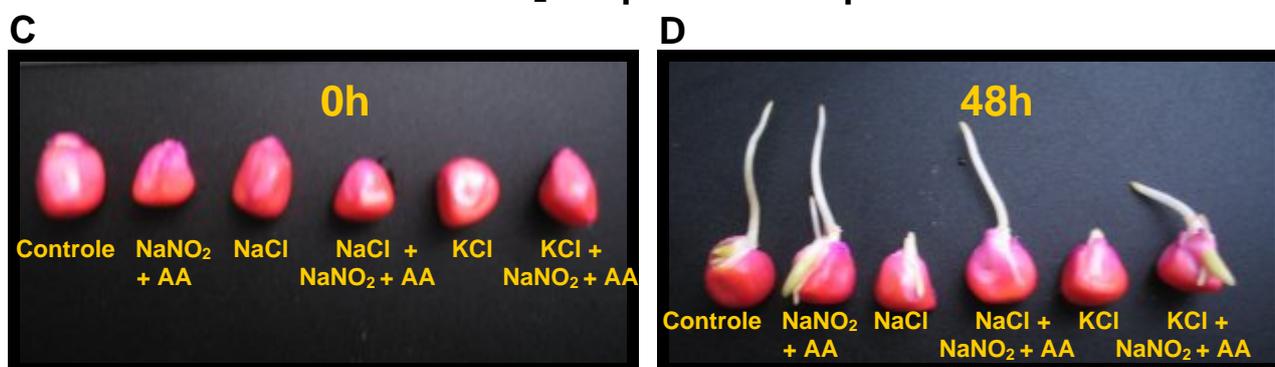
SNAP 10 μ MNaNO₂ 100 μ M + AA 200 μ M

Figura 5: Sementes de milho embebidas com SNAP 10 μ M ou NaNO₂ 100 μ M + AA 200 μ M, adicionados ou não de NaCl ou KCl a 0,3M.

As sementes de milho foram embebidas com doadores de NO (SNAP 10 μ M (A e B) ou nitrito de sódio 100 μ M e ácido ascórbico 200 μ M (C e D)) combinados ou não com NaCl ou KCl a 0,3M ou com água deionizada (controle). Após 24 horas de embebição as sementes foram germinadas durante 48 horas em água deionizada. Nos tempos 0h (A e C) e 48h (B e D) de germinação as sementes foram fotografadas com auxílio de uma câmera fotográfica digital Sony Cybershot 7.2 mp.

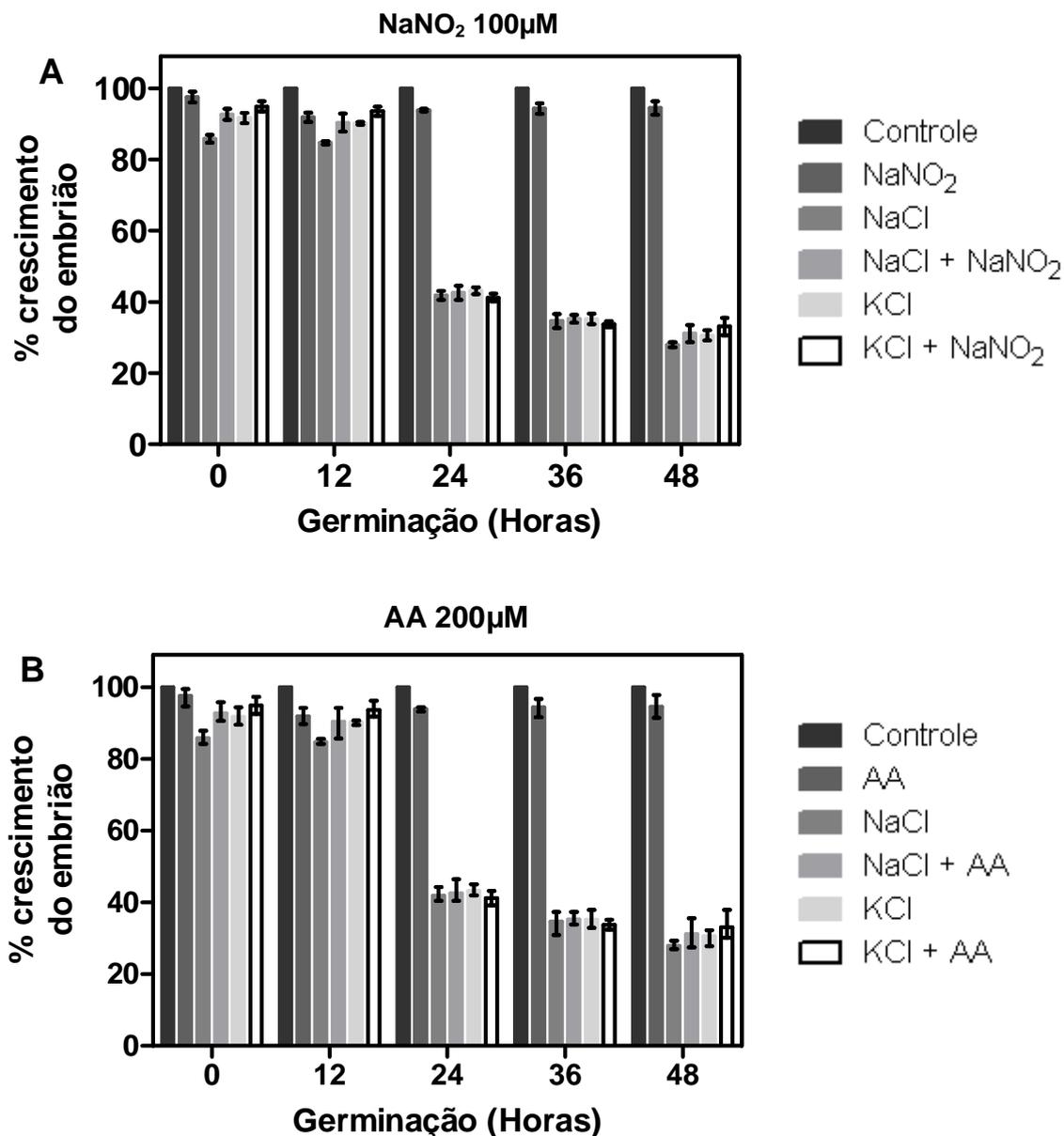


Figura 6: Índice de crescimento dos embriões de sementes de milho embebidas com NaNO₂ 100μM ou AA 200μM, adicionados ou não de NaCl ou KCl a 0,3M.

As sementes de milho foram embebidas com nitrito de sódio 100μM (A) ou ácido ascórbico 200μM (B) combinados ou não com NaCl ou KCl a 0,3M, ou com água deionizada (controle). Após 24 horas de embebição, as sementes foram germinadas durante 48 horas em água deionizada. Cinco embriões foram retirados em diferentes horários da germinação (0, 12, 24, 36 e 48 h) e medidos com régua milimetrada. Os resultados foram expressos em porcentagem de crescimento do embrião em relação ao controle (considerando o índice de crescimento de 100%).

IV.2.2. Conteúdo e perfil protéico dos embriões embebidos ou não com diferentes doadores de NO.

O conteúdo total de proteína nos homogenatos totais de todos os grupos de embriões de sementes de milho não apresentou variação significativa até 12 h de germinação, quando comparados ao controle. Todavia, embriões embebidos somente com água deionizada (controle) ou com doadores de NO apresentaram, a partir de 24 h, um aumento significativo ($P < 0,05$) de 0,1 mg ptn / ml. Nos embriões de sementes de milho embebidos em água contendo doadores de NO adicionados dos sais, esse aumento significativo ($P < 0,05$) do conteúdo protéico ocorreu a partir de 36 h de germinação, tempo no qual ocorreu a recuperação do crescimento dos embriões. A partir desse tempo, o conteúdo protéico foi significativamente ($P < 0,05$) igual ao controle. Nas sementes estressadas somente com os sais, a variação do conteúdo protéico não foi significativa ($P < 0,05$) durante as 48 horas de germinação (**Figuras 7 A e C**).

Ao analisarmos o conteúdo protéico pelo peso fresco do embrião (**Figuras 7 C e D**) encontramos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do conteúdo protéico a partir de 24 h de germinação. Quando submetemos as sementes de milho ao estresse salino, observamos que essa queda não ocorreu, apresentando valores que variaram de 10,7 mg ptn / mg P.F. no tempo 0 h a 8,6 mg ptn / mg P.F. no tempo 48 h de germinação.

Ao adicionarmos doadores de NO na água de embebição adicionada de NaCl e KCl a 0,3M, observamos uma queda no conteúdo protéico, a partir de 36 h de germinação, de 10,4 mg ptn / mg P.F no tempo 0 h para 3,8 mg ptn / mg P.F no tempo 48 h de germinação.

A fim de analisarmos o perfil protéico dos embriões de sementes de milho submetidos aos diferentes tratamentos, descritos anteriormente, aplicamos os homogenatos de embriões de sementes de milho em gel de poliacrilamida na presença de SDS 10%. Nas amostras controle (**Figura 8 A**), observamos uma degradação protéica progressiva ao longo da germinação (0 – 48 h). Na presença de NaCl ou KCl, não ocorre proteólise, independentemente do tempo de germinação analisado (**Figura 8 B**).

Porém, observamos uma maior degradação protéica a partir de 36h de germinação quando adicionamos SNAP 10 μ M, adicionados ou não de NaCl ou KCl a 0,3M na água de embebição (**Figuras 8 A e B**). Esses dados sugerem que o mecanismo de proteólise envolvido durante a germinação, é revertido quando os níveis de NO estão aumentados, via doadores de NO.

Os embriões de sementes embebidos com os sais apresentaram o mesmo conteúdo protéico ao longo da germinação. Em contrapartida, as sementes controle ou que tiveram doadores de NO na água de embebição mostraram um aumento do conteúdo protéico a partir de 12 horas, cujos valores aumentaram quase duas vezes até as 48 horas de germinação independente do doador de NO utilizado.

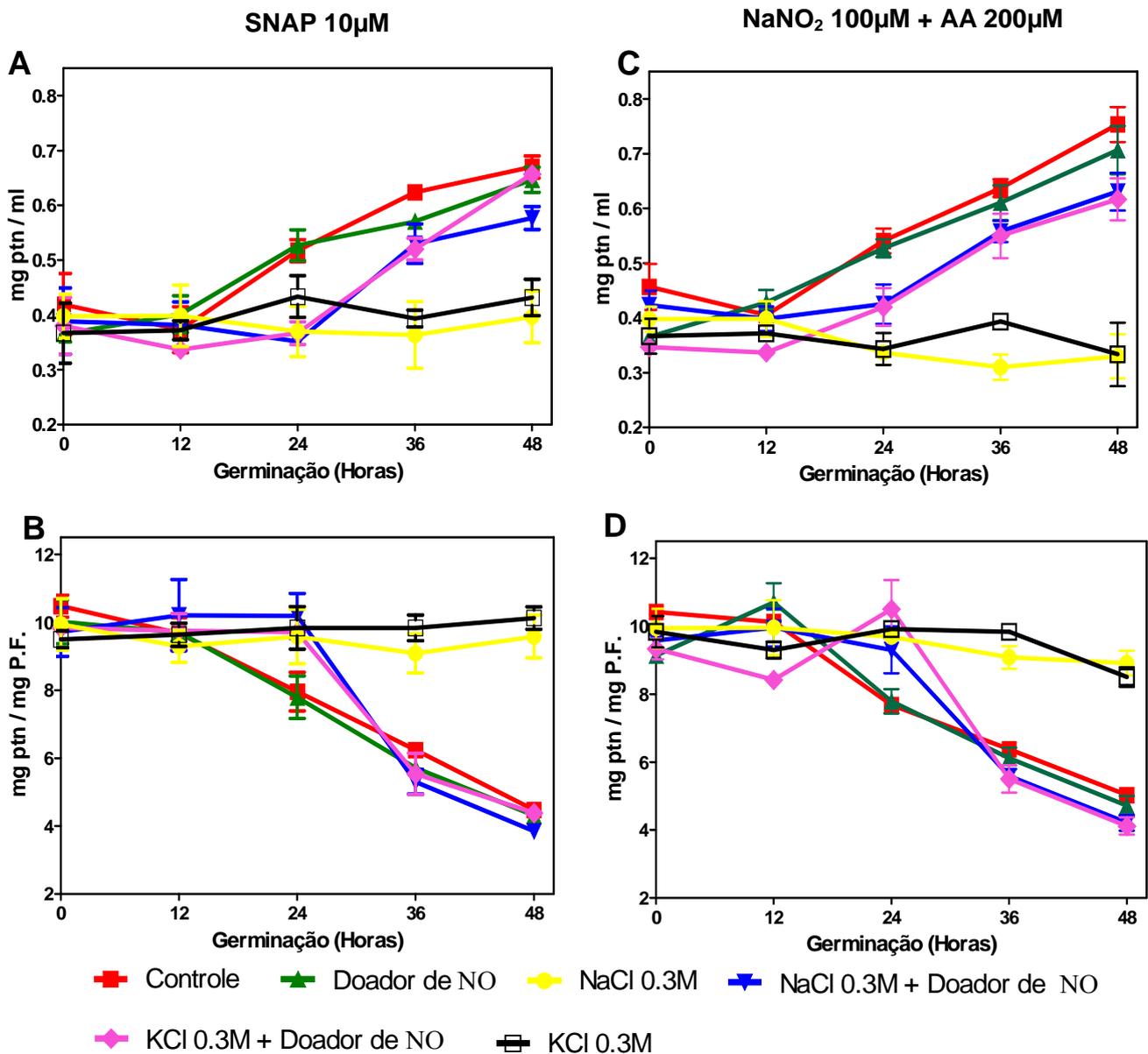


Figura 7: Conteúdo total de proteína nos embriões de milho embebidos com diferentes doadores de NO, combinados ou não com NaCl ou KCl.

As sementes de milho foram embebidas com doadores de NO (SNAP 10 μ M (A e B) ou nitrito de sódio 100 μ M e ácido ascórbico 200 μ M (C e D)) combinados ou não com 0,3M de NaCl ou KCl ou com água deionizada (controle). Após 24 horas de embebição, as sementes foram germinadas até 48 horas em água deionizada. Cinco embriões foram retirados em diferentes tempos da germinação (0, 12, 24, 36 e 48 h), homogeneizados em tampão acetato de sódio, 100mM, pH 5.0 e centrifugados à 12000 G por 5 minutos. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford e os dados expressos como mg ptn/ml. (A e C) ou mg ptn/ mg P.F. (B e D)

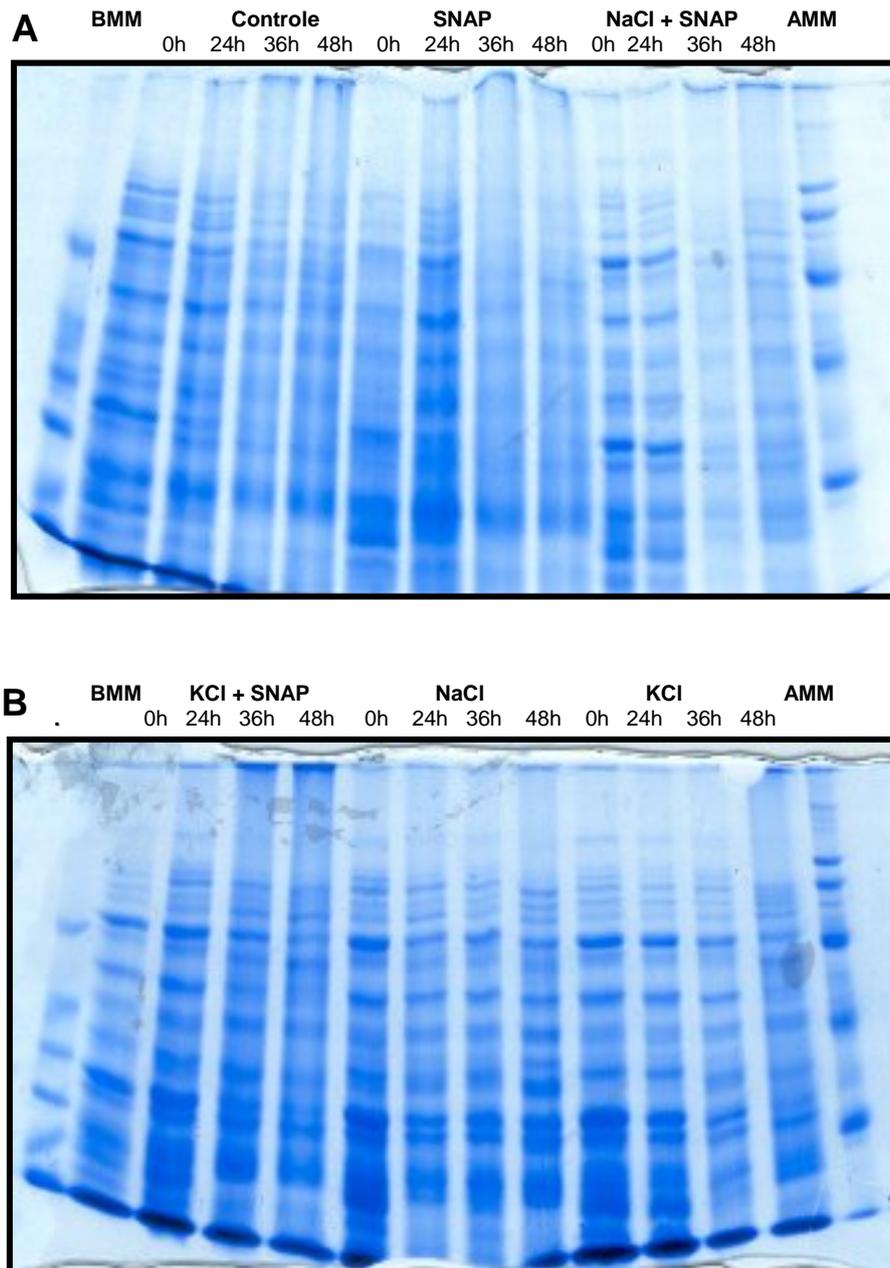


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (10%) de embriões de milho embebidos com NaCl ou KCl a 0,3M adicionados ou não de SNAP (10 μ M).

Cinco embriões foram retirados em 0, 12, 24, 36 e 48 h de germinação. 40 μ g de proteína de homogenatos totais de embriões de milho embebidos com água deionizada (controle) ou com SNAP 10 μ M combinados ou não com 0,3 M de NaCl ou KCl. Os padrões de baixa massa molecular (BMM) correspondem a 66, 45, 36, 29, 24, 20,1 e 14,2 kDa e os de alta massa molecular (AMM), 205, 116, 97,6, 66, 29 e 20,1kDa, respectivamente.

IV.2.3. Atividade de tirosina fosfatase e conteúdo total de fosfato livre dos embriões embebidos ou não com diferentes doadores de NO.

Na **Figura 9**, observamos uma recuperação significativa na atividade p NPPásica quando se adicionou SNAP 10 μ M ou NaNO₂ 100 μ M + AA 200 μ M, adicionados ou não de NaCl ou KCl 0,3M, na água de embebição. Essa atividade apresentou-se 10 vezes maior quando comparada com a atividade medida somente com o uso dos sais na água de embebição. Contudo, essa atividade foi 2 vezes menor que a atividade do controle. Pode-se, ainda, observar que somente a adição de qualquer doador de NO não influenciou significativamente a atividade de tirosina fosfatase, apresentando valores estatisticamente iguais ao controle quando $p < 0.05$.

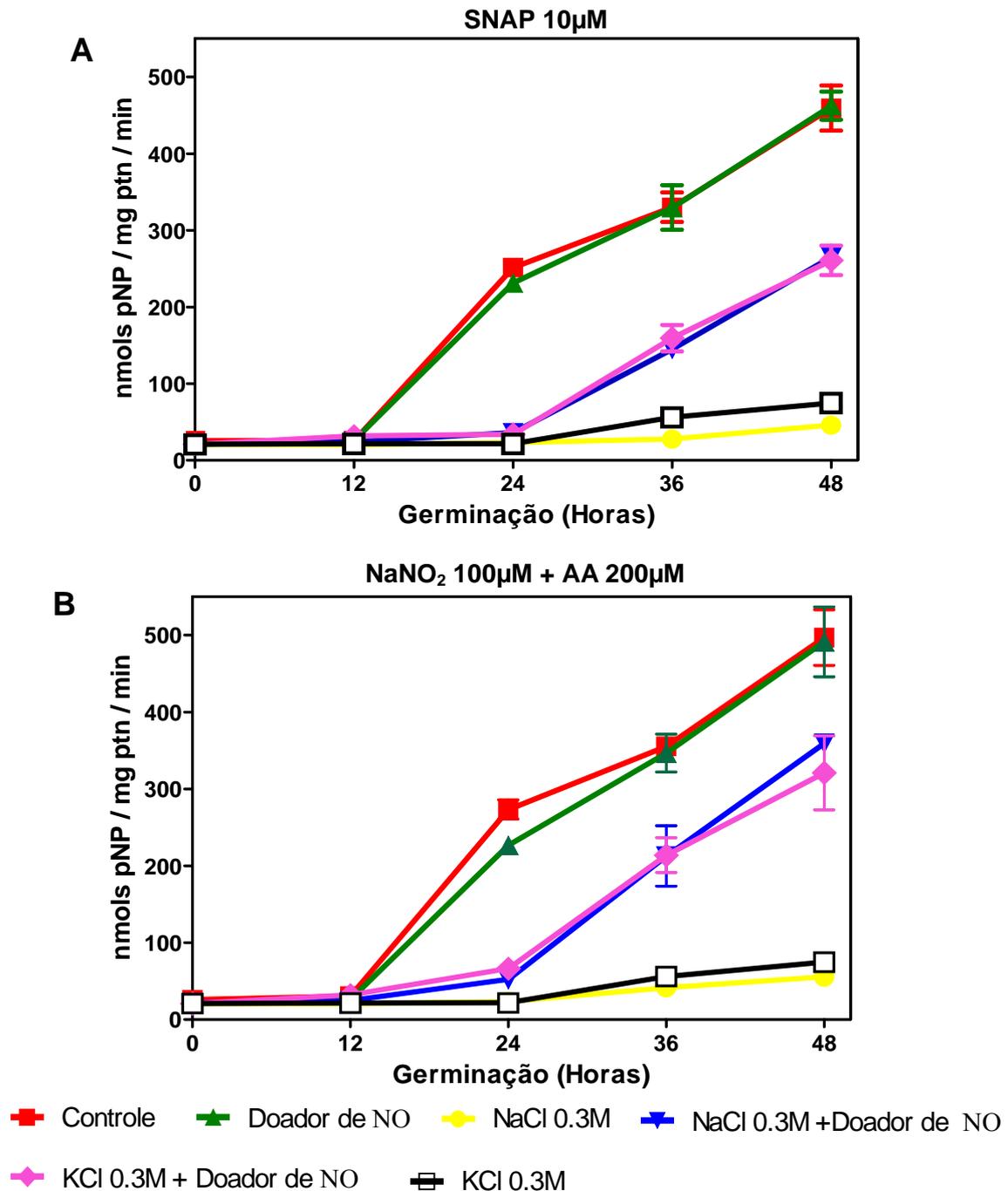


Figura 9: Atividade de tirosina fosfatase nos embriões de milho embebidos com 0,3M de NaCl ou KCl adicionados ou não de doadores de NO.

As sementes de milho foram embebidas com doadores de NO (SNAP 10 μ M (A) ou nitrito de sódio 100 μ M e ácido ascórbico 200 μ M (B)) combinados ou não com 0,3M de NaCl ou KCl ou com água deionizada (controle). Após 24 horas de embebição, as sementes foram germinadas durante 48 horas em água deionizada. A atividade pNPásica foi medida usando o homogenato total e pNPP como substrato. Os resultados estão expressos em nmols pNP / mg ptn / min.

Em relação ao conteúdo total de fosfato livre, ocorreu um aumento significativo (quando $P < 0,05$) de 778,3 para 1578,4 nmols Pi / mg ptn durante as 48h de germinação, e o mesmo perfil foi obtido quando se adicionou doadores de NO. Todavia, quando se adicionou doadores de NO (SNAP 10 μ M ou NaNO₂ 100 μ M + AA 200 μ M), com NaCl ou KCl a 0,3M na água de embebição ocorre um aumento significativo (quando $P < 0,05$) no conteúdo de fosfato livre comparado às amostras que continham somente os sais na água de embebição. Entretanto, o conteúdo de fosfato livre nas amostras que tiveram somente os sais, apresentou um aumento não significante (quando $P < 0,05$) ao longo da germinação em torno de 10% (**Figura 10**).

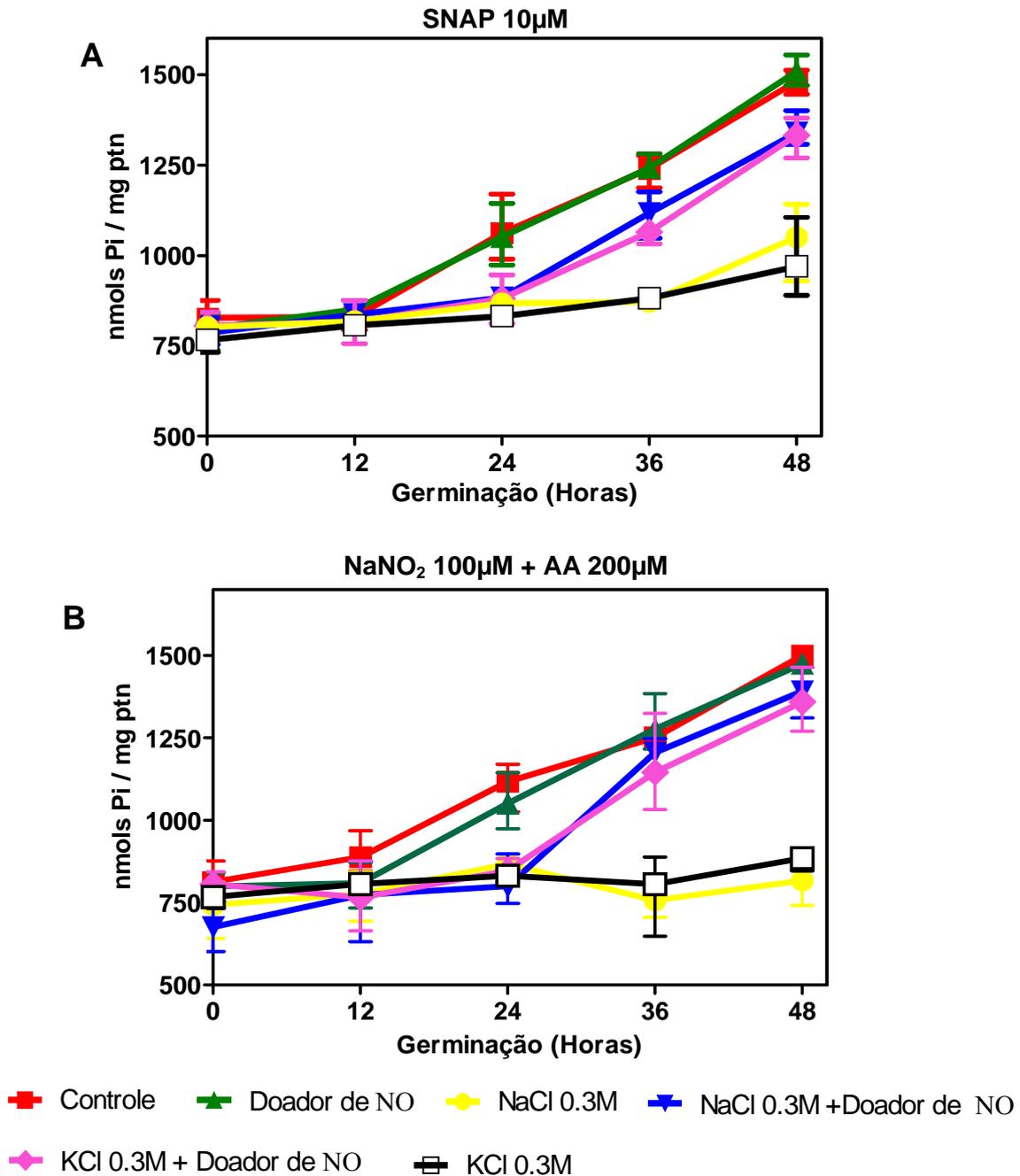


Figura 10: Conteúdo total de fosfato livre nos embriões de milho embebidos com 0,3M de NaCl ou KCl adicionados ou não de doadores de NO.

As sementes de milho foram embebidas por 24h com concentrações crescentes de doadores de NO (SNAP 10 μ M (A) ou uma solução contendo nitrito de sódio 100 μ M e ácido ascórbico 200 μ M (B)) combinados ou não com 0,3M de NaCl ou KCl ou com água deionizada (controle) e germinadas durante 48 horas em água deionizada. As concentrações de fosfato foram medidas no homogenato total através do método descrito por Fiske-Subbarow(1925). Os resultados estão expressos em nmol Pi/ mg ptn/ min.

IV.2.4. Determinação da peroxidação lipídica nos embriões embebidos ou não com diferentes doadores de NO.

A peroxidação lipídica foi avaliada através da formação de MDA pelo método de TBARS. Quando se adicionou SNAP 10 μ M ou NaNO₂ 100 μ M + AA 200 μ M, adicionados ou não de NaCl ou KCl 0,3M, na água de embebição, encontramos níveis significativamente (quando $P < 0,05$) menores de peroxidação lipídica do que quando somente se adicionou os sais, independentemente do tempo de germinação analisado. Essa redução foi mais pronunciada em 48 horas de germinação, conforme pode ser visualizado nas **Figuras 11 C e F**.

Observa-se também que ocorreu uma redução significativa (quando $P < 0,05$) da peroxidação lipídica em torno de 3x nas amostras controle (sem sal) e embebidas somente com doadores de NO de 0 h para 48 h de germinação. Contudo, esta redução não foi observada nos embriões embebidos somente com NaCl ou KCl a 0,3M (**Figura 11**).

Adicionalmente, observamos uma semelhança no perfil de redução da peroxidação lipídica nos dois doadores de NO utilizados.

Concluimos que, para o NO inibir a peroxidação lipídica de sementes germinadas, as mesmas deverão ter sido estressadas, previamente, com sal.

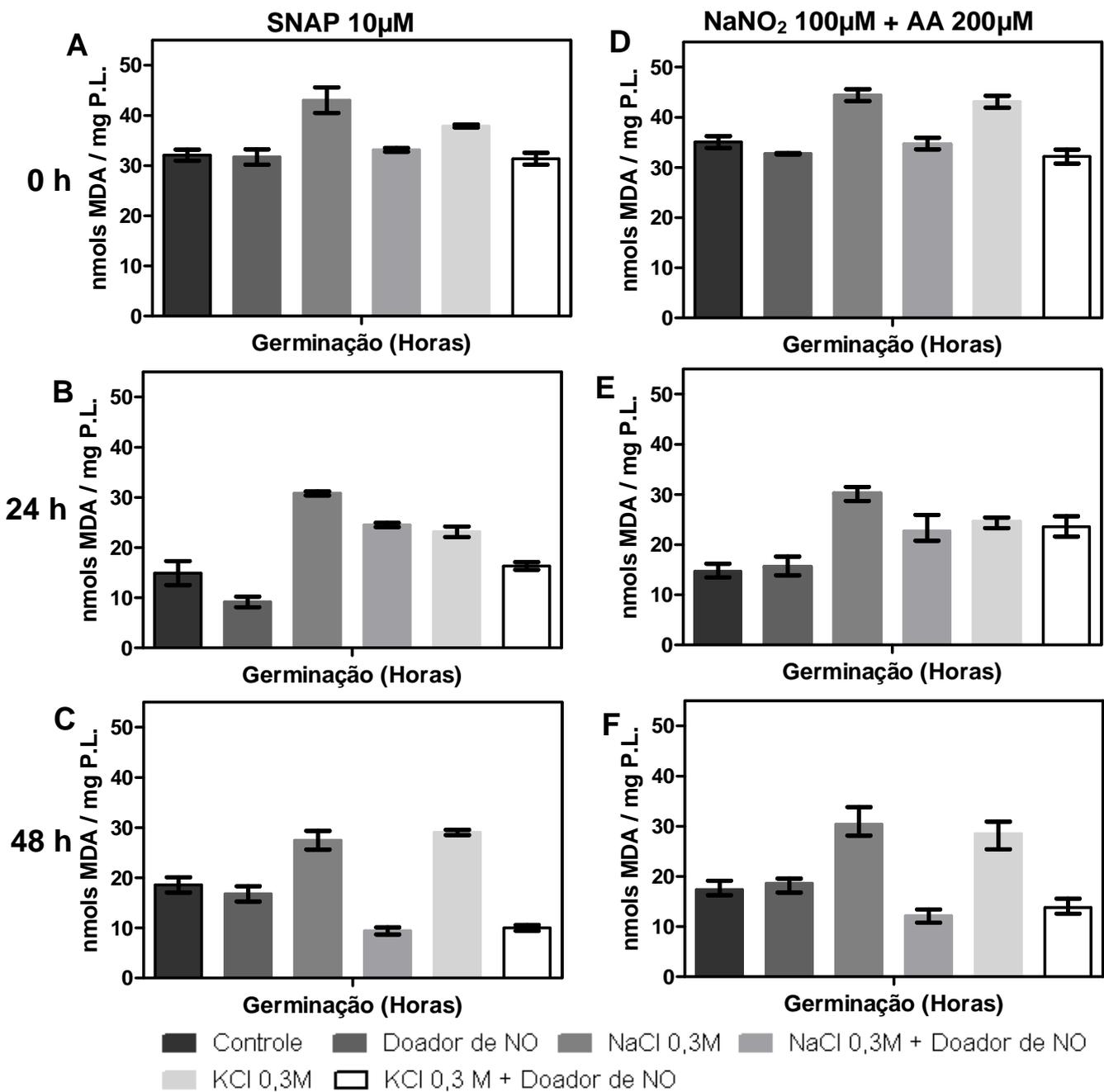


Figura 11: Peroxidação lipídica nos embriões de milho embebidos com de NaCl ou KCl a 0,3M adicionados ou não de doadores de NO.

As sementes de milho foram embebidas por 24h com concentrações crescentes de doadores de NO (SNAP 10µM (A) ou uma solução contendo nitrito de sódio 100µM e ácido ascórbico 200µM (B)) combinados ou não com 0,3M de NaCl ou KCl ou com água deionizada (controle) e germinadas durante 48 horas em água deionizada. 0,1g de embriões foram retirados em diferentes tempos da germinação (0, 24 e 48 h). O grau de peroxidação lipídica foi avaliado pelo método de TBARS, através da formação de MDA, o qual é calculado pelo coeficiente de extinção molar de 155 mM/cm.

IV.2.5 Conteúdo de nitrato dos embriões embebidos ou não com diferentes doadores de NO.

No presente estudo, conforme a semente germinou, ocorreu aumento no conteúdo de nitrato nos homogenatos totais dos embriões de milho controle, com valores que variaram de 1,4; 2,5 e 4,1 μmols nos tempos 0, 24 e 48 h, respectivamente.

Notou-se também que as sementes de milho embebidas somente com os sais apresentaram uma variação não significativa ($P < 0,05$) de nitrato de 1,2 a 1,9 μmols , independentemente do tempo de germinação analisado. Contudo, ao adicionar doadores de NO (SNAP 10 μM ou NaNO_2 100 μM + AA 200 μM), na água de embebição juntamente com NaCl ou KCl 0,3 M, o conteúdo de nitrato aumentou significativamente em 50 %. Observamos que o conteúdo nitrato nas amostras embebidas em água deionizada e com os doadores de NO, aumentaram cerca de três vezes do início ao final da germinação (**Figura 12**).

Na **Figura 12**, deve-se ressaltar, ainda, que os valores encontrados para o conteúdo de nitrato não diferem significativamente (quando $P < 0,05$) entre os doadores de NO utilizados, apresentando perfil semelhante.

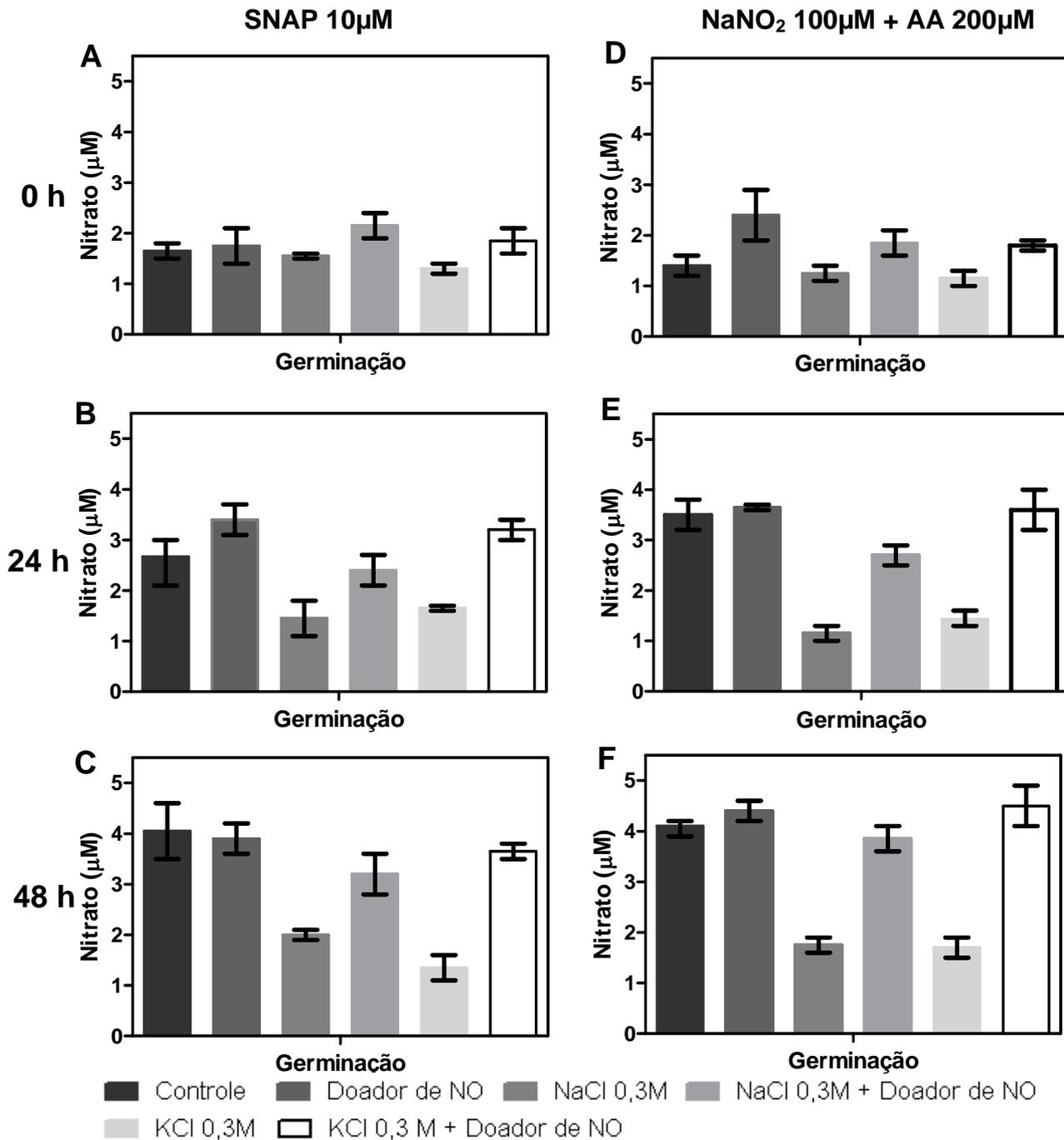


Figura 12: Conteúdo de nitrato nos embriões de milho embebidos com 0,3M de NaCl ou KCl adicionados ou não de doadores de NO.

As sementes de milho foram embebidas por 24h com doadores de NO (SNAP 10µM (A) ou uma solução contendo nitrito de sódio 100µM e ácido ascórbico 200µM (B) combinados ou não com 0,3M de NaCl ou KCl ou com água deionizada (controle) e germinadas durante 48 horas em água deionizada. 30µl de homogenato total proveniente dos diferentes tempos de coleta dos embriões, foram submetidos ao ensaio fluorimétrico de nitrato, utilizando kit da Calbiochemistry conforme descrito na seção de Material e Métodos.

Logo, observamos que os doadores de NO utilizados são capazes de reverter os efeitos deletérios causados ao crescimento do milho nesta fase da germinação. Concomitantemente a este fato, observamos uma recuperação na atividade fosfatásica após 36 h de germinação, acompanhado da recuperação da proteólise, mecanismo pós traducional importante para o crescimento da semente nesta fase do seu ciclo germinativo.

Além disso, a diminuição da peroxidação lipídica e o aumento do conteúdo de nitrato colaboraram para tal recuperação do crescimento das sementes de milho estudadas, quando estas foram submetidas ao estresse por NaCl e KCl.

V. Discussão:

V.1. Embebição com diferentes sais.

Todos os sais mostraram um efeito deletério na germinação do milho, principalmente em concentrações entre 0,2 e 1,0 M. Provavelmente essa ação foi primeiramente por efeito osmótico e secundariamente pelo aumento da toxicidade iônica (Mühlin e Läuchli, 2002). A alta salinidade provoca redução no turgor celular diminuindo em última análise o crescimento e a divisão celular (Neves-Piestun e Bernstein, 2001)

De acordo com Mühlin e Läuchli (2001) um modelo para resposta do crescimento em plantas quando submetidas a alta salinidade, foi caracterizado, primeiramente pela redução do crescimento por efeitos osmóticos e posteriormente, em fases de maior atraso no desenvolvimento (como aparecimento de folhas) esse efeito é induzido pela toxicidade iônica, que pode provocar, por exemplo, necrose no tecido da folha.

A adaptação em baixas de sais se dá possivelmente por alguns mecanismos adaptativos como: ativação de H⁺ ATPase (Babakov *et al.*, 2000), síntese de osmoprotetores (Russel *et al.*, 1998), aumento da atividade de Na⁺/H⁺ ATPase, aumentando o efluxo de Na⁺ (Rodriguez-Navarrese e Serrano, 2001, Xia *et al.*, 2002), além da ativação de cinases ligada na proteção de estresse salino, como MAPK e proteínas cinases dependentes de cálcio (Kanhonou *et al.*, 2001, Defferred *et al.*, 2002).

A atividade de tirosina fosfatase foi diminuída quando NaCl, KCl, NaI e KI foram adicionados na água de embebição. Esse resultado está vinculado com o fato desta enzima pode ser percebida por uma proteína chave de sinalização celular pela oxidação de resíduos de cisteína conservados (Xiong, *et al.*, 2002). Estudos recentes têm mostrado que ativação de MAPK de plantas também está correlacionada com fosforilação de resíduos de tirosina. Uma análise bioquímica detalhada realizada por Huang, *et al.*, (2000) confirma que uma MAPK de planta (AtMPK4) é fosforilada em um resíduo de tirosina durante o processo de ativação. Defosforilação de fosfotirosina por AtPTP1, uma tirosina-específica PTP de *Arabidopsis*, resultando na perda da atividade de MAPK. Esse resultado demonstra que a fosforilação de tirosina é essencial para ativação de MAPK de plantas (Huang *et al.*, 2000). Essas enzimas são ativadas por estresse salino em diferentes tempos após o início do estresse, e a ativação dessas MAPK também ocorre em diferentes períodos de tempo (Mikolajczyk *et al.*, 2000).

Em um estudo de Liao *et al.* (2003), mostrou um aumento da síntese de um gene de uma fosfatase ácida púrpura (*purple acid phosphatase*) em soja submetida ao estresse por NaCl, esse resultado sugere um papel fisiológico do GmPAP3, talvez relacionado com a adaptação da soja ao estresse por NaCl, possivelmente através do seu envolvimento com formação e/ou varredura de espécies reativas de oxigênio ou vias de transdução de sinal em resposta ao estresse.

Solutos osmolares são importantes para adaptação da planta em salinidade. Nossos resultados mostraram um aumento do conteúdo de prolina e açúcares redutores em 0,2, 0,5 e 1,0 M de todos os sais estudados e em 0,02 M o conteúdo destes osmólitos mostrou um perfil similar às amostras controle (não adicionadas de sal). Estes resultados estão em concordância com os dados de Khedr *et al.* (2003), onde foi observado que o estresse salino foi capaz de reduzir o crescimento, particularmente a 0,3mM de NaCl, com um aumento significativo de prolina (Khedr *et al.*, 2003)

Esse estudo mostrou que a exposição de sementes de milho a concentrações crescentes de NaCl, KCl, NaI e KI, promoveu um retardo no crescimento do embrião concomitante com a inibição da atividade de tirosina fosfatase e acúmulo de solutos osmolares. Observando estes resultados, especula-se que o impacto da exposição a alta salinidade ligado a inibição da atividade fosfatásica foi deletério para as sementes de milho nesta fase da germinação, logo, estas sementes não são tolerantes ao sal nesta fase da germinação

V.2 Embebição de sementes de milho com doadores de NO, adicionados ou não de NaCl ou KCl.

O crescimento do embrião foi acompanhado da recuperação da atividade pNPPásica da tirosina fosfatase a partir de 36h de germinação com doadores de NO adicionados de 0,3M de NaCl ou KCl.

Essa recuperação da germinação se dá, provavelmente, pela diminuição da concentração das espécies reativas de oxigênio, que estariam aumentadas na situação de estresse (Delledonne *et al.*, 2003).

O acréscimo do conteúdo de espécies reativas de oxigênio em plantas submetidas ao estresse salino, não seria proporcional ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes, promovendo então danos irreversíveis à planta (Di Baccio, 2004). Entretanto, Kopyra e Gwózdź (2003) mostraram que o pré-tratamento com doador de NO (SNP) em sementes de tremoços aumentaram a atividade de superóxido desmutase quando essas sementes foram submetidas ao estresse por NaCl (200 mM), cádmio (50 μ M) e chumbo (700 μ M).

Além disso, o NO funciona como um sinalizador celular, estimulando vias adaptativas ao estresse salino dependentes das cascatas de MAPK, mecanismo ainda não elucidado.

Suspeita-se da interação destas enzimas com ácido salicílico e na indução de enzimas ligadas à síntese de ácido jasmônico, considerado um osmoprotetor, conferindo adaptação da planta ao estresse osmótico (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007).

O óxido nítrico estimula a fosforilação protéica em células oclusivas ou guardiãs de plantas, que seria um pré-requisito para a entrada de cálcio celular, estimulando assim a síntese de canais iônicos, favorecendo a entrada de potássio no citossol celular (Sokolovski *et al.*, 2005). Esse fato leva a homeostase celular, promovendo adaptação ao estresse salino.

Além disso, a alta salinidade inibe canais de cálcio, diminuindo a entrada de cálcio celular e, por conseguinte diminuindo a atividade de vias dependentes de GMP cíclico e ADP-ribose (Garcia-Mata *et al.*, 2003). O óxido nítrico estimula a fosforilação destes canais de cálcio em situações de estresse hídrico, aumentando sua atividade e, por conseguinte a entrada de cálcio celular (Sokolovski *et al.*, 2005).

A atividade da tirosina fosfatase diminuída nos embriões quando submetidos ao estresse salino sob essas concentrações de sais citadas anteriormente, e seu aumento quando a germinação é recuperada ao se adicionar doadores de NO (**Figura 9**), corrobora com o fato desta enzima estar intimamente ligada ao processo de germinação do milho, como já foi descrito pelo nosso grupo (Senna, 2003, Senna *et al.*, 2006).

Adicionalmente, observa-se que quando se adicionou doadores de NO juntamente com os sais encontram-se níveis menores de peroxidação lipídica do que quando somente se adicionou os sais. Isso pode ser explicado pelo fato do NO em baixas doses ser considerado um varredor de radicais livres, como íon peróxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio, os quais promovem além da peroxidação lipídica, danos no DNA, injúria no pigmento de clorofila, dentre outros fatores (Demiral e Türkan, 2004, Beligni e Lamattina, 1999).

Um dos mecanismos de regulação de proteínas fosfatase é por peróxido de hidrogênio, o que leva a uma mudança na sua conformação e inibe reversivelmente essa enzima (Gupta e Luan, 2003). Como o conteúdo de peróxido de hidrogênio, geralmente, está aumentado quando a planta é submetida ao estresse salino (Hu, *et al.*, 2006), esse fato provocaria, provavelmente, essa diminuição na atividade de tirosina fosfatase quando a planta é submetida ao estresse.

A recuperação da atividade a partir das 36 h de germinação em embriões de milho submetidos ao estresse salino acrescidos de doadores de NO, também pode ser explicada, pela via supracitada, já que, em situação de estresse, o NO atua como um varredor de espécies oxidativas, incluindo o peróxido de hidrogênio (Demiral e Türkan, 2004, Beligni e Lamattina, 1999), e, por conseguinte, a atividade fosfatásica ficaria novamente aumentada.

Concomitante a esse aumento da atividade fosfatásica, observamos um aumento, do conteúdo de fosfato livre (**Figura 10**). Em embriões de sementes embebidas com concentrações superiores a 0,2 M dos diferentes sais estudados este evento não ocorreu. Contudo, ao se adicionar doadores de NO juntamente com sais, na água de embebição, esse efeito negativo foi revertido. Isto pode ser explicado pela inibição da atividade da fosfatase em embriões de sementes submetidas ao estresse salino, e sua recuperação pela adição de doadores de NO (**Figura 9**) ou pelo fato do estresse salino provocar o aumento de mio-inositol-fosfato sintase, promovendo assim diminuição do conteúdo de fosfato livre no meio (Das-Chatterjee, 2006). O aumento do conteúdo de fosfato

quando se adiciona doadores de NO pode ser explicado pelo retorno da atividade de fosfatase encontrada na **(Figura 9)**.

Em relação ao nitrato, observamos que este conteúdo é aumentado 50% quando se adiciona doadores de NO aos sais de sódio e potássio, em relação aos embriões de sementes embebidas somente com esses sais. Esse resultado pode ser explicado, pois quando se adiciona doadores de NO em meios de germinação ocorre um estímulo à formação de nitrato em embriões de plantas (Simontacchi *et al.*, 2004).

Provavelmente esse aumento na formação de nitrato, provoca um acréscimo da formação de reservas de nitrogênio na planta, favorecendo assim o crescimento do vegetal (Bethke *et al.*, 2004 e Kaiser *et al.*, 2002), e também pode estar influenciando na recuperação do crescimento do embrião, juntamente com os outros parâmetros supracitados.

O conteúdo de nitrato intracelular está, proporcionalmente, ligado ao potencial de membrana, isto é, níveis aumentados de nitrato conferem turgor celular e, conseqüente, aumento do potencial de membrana, conferindo assim diminuição da permeabilidade celular e, por conseguinte adaptação ao estresse salino (Fen *et al.*, 2007).

Concomitante aos dados supracitados observou-se uma recuperação da proteólise, que estava inibida em sementes submetidas ao estresse salino, ao adicionarmos NO juntamente ao sal na água de embebição dessas sementes **(Figura 8)**.

A proteólise de proteínas de reserva em sementes é um ponto crítico para os processos de germinação e crescimento. Em estágios iniciais, essas proteínas são clivadas em subunidades de menor massa molecular por enzimas proteolíticas (Tan-Wilson *et al.*, 1996).

Um estudo de Sheokand *et al.*, (2005) mostrou que uma cisteíno protease de planta forrageira (*Medicago truncatula*) estaria ativada durante a germinação e tolerância ao estresse (Sheokand, *et al.*, 2005). Essa classe de enzima está ligada à morte celular promovida pelo ataque de patógenos (Beers *et al.*, 2000), mobilização de proteínas durante a germinação, favorecendo o crescimento sadio da semente (Schlereth *et al.*, 2000).

O aumento da degradação protéica corrobora com o fato da diminuição significativa do conteúdo protéico da fração citosólica, a partir de 36 h de germinação, em embriões de sementes de milho embebidos com NaCl ou KCl a 0,3 M adicionados dos doadores de NO (**Figuras 7 C e D**).

Provavelmente, esse aumento da degradação protéica quando se adicionou doadores de NO juntamente com os sais na água de embebição de sementes de milho (**Figura 8**), contribuiu para a recuperação do crescimento, via doadores de NO, dos embriões submetidos ao estresse salino (**Figura 4**).

Neste trabalho observamos uma forte associação entre a retomada do crescimento dos embriões de milho submetidos ao estresse salino, quando adicionados de doadores de NO. Além disso, o aumento da atividade de tirosina fosfatase, a diminuição da peroxidação lipídica, a retomada da degradação de proteínas de reserva e o aumento do conteúdo de nitrato ao longo da germinação do milho colaboraram para tal evento.

VI. Conclusões

VI.1 Embebição com diferentes sais

- O estresse salino causado por NaCl, KCl, NaI e KI quando adicionados na água de embebição foi capaz de retardar o crescimento dos embriões de sementes de milho. Concomitante a este fato, observamos a inibição da atividade fosfatásica.

- Foi observado a degradação de uma fosfotirosina de 14kDa, provável alvo da tirosina fosfatase, nos embriões controle e naqueles que foram embebidos com os diferentes sais a concentração de 0,02 M. Contudo, em concentrações de 0,2 M e 1,0 M essa degradação não foi notada.

- Nos cortes histoquímicos, observou-se a atividade fosfatásica aumentada no meristema apical em embriões controle às 24 h de germinação. Entretanto nos embriões embebidos com os diferentes à concentração de 0,2 M neste mesmo período de germinação, não foi observada essa atividade.

VI.2 Embebição de sementes de milho com doadores de NO, adicionados ou não de NaCl ou KCl

- Doadores de NO (SNAP 10 μ M e NaNO₂ 100 μ M + AA 200 μ M) foram capazes de promover a recuperação do crescimento, em 36 h de germinação, dos embriões de milho submetidos ao estresse salino (embebidos com NaCl e KCl a 0,3 M).
- Somente os doadores de NO não promoveram qualquer alteração no crescimento da semente.
- Isoladamente, NaNO₂ 100 μ M e AA 200 μ M não foram capazes de reverter a inibição do crescimento causada pelos sais adicionados na água de embebição.
- A atividade de tirosina fosfatase, em níveis basais nos embriões embebidos apenas com NaCl e KCl 0,3 M, quando adicionados de doadores de NO (SNAP 10 μ M e NaNO₂ 100 μ M + AA 200 μ M) foi recuperada a partir das 36 h de germinação. Concomitante a este fato, o conteúdo de fosfato livre acompanhou o aumento da atividade fosfatásica.
- Ao analisar o perfil protéico, observamos uma diminuição da atividade proteolítica em embriões de sementes submetidas ao estresse salino. Logo, quando se adicionou NO juntamente com os sais na água da embebição esses níveis de proteólise retornaram os perfis dos controles a partir das 36 h de germinação.

- Observamos também, um aumento da peroxidação lipídica nos embriões embebidos com NaCl e KCl 0,3 M. Logo, ao se adicionar doadores de NO nesta água de embebição, esses níveis de peroxidação lipídica diminuíram a níveis próximos aos do controle.
- Em relação aos níveis de nitrato, SNAP e NaNO_2 + AA foram capazes aumentar a produção deste íon nos embriões das sementes submetidas ao estresse por NaCl e KCl.
- Logo, conclui-se que os doadores de NO estudados são capazes de reverter os efeitos deletérios ocasionados pelo estresse salino, recuperando o crescimento do embrião, via aumento da atividade de tirosina fosfatase, recuperar a proteólise e reduzir a peroxidação lipídica.

8. Referências bibliográficas:

- AMARAL, FCS; PEREIRA, NR, CARVALHO-JÚNIOR, W. Principais limitações dos solos do Brasil. **EMBRAPA-CNPS**, 1999
- APSE, MP, BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Plant Biotechnology**, 2002, 13, 146-150
- ARASIMOWICZ, M, FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, 2007, 172:876-887
- AZEVEDO-NETO, AD, PRISCO, JT, ENÉAS-FILHO, J, ABREU, CEB, GOMES-FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, 2006, 56:87–94
- BARIZZA, E; SCHIAVO, FL; TERZI, M; FILIPPINI, F. Evidence suggesting protein phosphorylation in plants depends on the developmental conditions. **FEBS**, 1999, 447: 191-194.
- BATES, LS, WALDERN, RP, TEARE, ID. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**. 1973, 39:205–207.
- BEERS EP, WOFFENDEN BJ, ZHAO C. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. **Plant Molecular Biology**. 2000;44(3):399-415
- BELIGNI, MV, LAMATTINA, L. Nitric oxide – a non-traditional regulator of plant growth. **Trends in Plant Science**, 1999, 6, 508-509
- BETHKE, P.C. *et. al.* Apoplastic syntesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, 2004, 16, 32-341
- BHARGAVA, R AND SACHAR, RC. Chloramphenicol stimulates acid phosphatase activity in germinating cotton (*Gossypium hirsutum*) embryos. **The Biochemical Journal**, 1992, 212 73-77.
- BISWAS, TK, CUNDIFF, C. Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*. **Phytochemistry**, 1991, 30, 2119-2125.
- BISWAS, TK; PROMO, M AND BISWAS, B. Purification of acid phosphatase I from germinating seeds of *Vigna sinensis*. **Phytochemistry**, 1996, 41:6, 1457-1458.

- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72, 248-257.
- BRASIL. Ministério da Agricultura/ Ministério do Interior. Levantamento exploratório-reconhecimento de solos. Recife, 1973. 301p
- CAPONE, R, TIWARI, SB, LEVINE, A. Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2004, 42, 425-428.
- COWIESON, AJ. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers . **Animal Feed Science and Technology**, 2005, 119, 293-305
- COHEN, P.. The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. **Trends in Biochemical Sciences**, 2000, 25, 596-601
- CONAB. **Milho total (1ª e 2ª safra) Brasil** - Série histórica de área plantada - safra 1976-77 a 2005-06. Disponível em < <http://www.conab.gov.br/download/safra/MilhoTotalSerieHist.xls> > Acesso em: 02 maio 2006.
- COUEE I, SULMON C, GOUESBET G, EL AMRANI A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2006; 57(3):449-5
- CORPAS FJ, BARROSO JB, CARRERAS A, QUIROS M, LEON AM, ROMERO-PUERTAS MC, ESTEBAN FJ, VALDERRAMA R, PALMA JM, SANDALIO LM, GOMEZ M, DEL RIO LA. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. **Plant Physiology**. 2004;136(1):2722-33
- CRAWFORD, NM, GUO, FQ. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions, *Trends in Plant Science*, 2005, 10, 195-200.
- DAS-CHATTERJEE, A, GOSWAMI, L, MAITRA, S, DASTIDAR, K G, RAY, S, MAJUMDER, A.L. Introgression of a novel salt-tolerant L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (*PcINO1*) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. **FEBS Letters**, 2006, 580(16):3980-3988

- DEBOUBA M, GOUIA H, SUZUKI A, GHORBEL MH. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. **Journal Plant Physiology**. 2005;163(12):1247-1258
- DEBOUBA M, MAÂROUFI-DGHIMI H, SUZUKI A, GHORBEL MH, GOUIA H. 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**. 2007; 99(6):1143-51.
- DEEKS MJ, HUSSEY PJ, DAVIES B. Formins: intermediates in signal-transduction cascades that affect cytoskeletal reorganization. **Trends in Plant Science**. 2002; 7(11):492-498.
- DELLEDONNE, M, POLVERARI, A, MURGIA, I. The functions of nitric oxide-mediated signaling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2003, 5(1):33-4.
- DEL RIO, LA, CORPAS, FJ, SANDALIO, LM, PALMA JM, BARROSO, JB. Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life*. 2003, 55(2):71-81
- DEL RIO, AL, CORPAS, JF, BARROSO, BJ. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. **Phytochemistry**, 2004, 65, 783-792.
- DEMIRAL, T, TIRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, 2004, 53, 247-257
- DI BACCIO, D; NAVARI-IZZO, F; IZZO, R. Seawater irrigation: antioxidant defence responses in leaves and roots of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) ecotype. **Journal of Plant Physiology**, 2004, 61(12), 1359-1366
- DUARTE, JC. Mercado e comercialização do milho no Brasil. **EMBRAPA Milho e Sorgo**, 2006. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/mercado.htm> acesso em 05/12/2006.
- DUARTE, JO, CRUZ, JC, GARCIA, JC E MATTOSO, MJ, Economia na produção e utilização do milho. **EMBRAPA Milho e Sorgo**, 2006. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/economiaadprodu.htm> acesso 05/12/2006

- DUBOIS, M GILLES, G, HAMMITON, JK, REBERS, PA, SMITH, F. A colorimetric method for the stimations of sugars and related substances. **Annalitical Biochemistry**, 1956, 28:350-356.
- DURNER, J, KLESSIG, D. F. Nitric oxide as a signal in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 1999, 2 (5) 369-374
- DURZAN, D.J. AND PEDROSO, M.C., Nitric oxide and reactive nitrogen oxide species in plants. **Biotechnology, Genetic and Engennier Rewiew**, 2002, 19, 293-337
- EMBRAPA, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM SOLOS, Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília:EMBRAPA, 1999, 412p.
- EMBRAPA MILHO E SORGO, em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>, 29/05/2006.
- FEN X, JIA L, LI Y, SMITH SJ, MILLER AJ, SHEN Q. Comparing nitrate storage and remobilization in two rice cultivars that differ in their nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**. 2007; 58(7):1729-40
- FERREIRA, CV; GRANJEIRO, JM; TAGA, EM; AOYAMA, H. Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatase. **Plant Physiology and Biochemistry**, 1998, 36, 487-494.
- FISKE, CH, SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J.B.C.**, 1925, 375-400
- GARCIA-MATA, C. AND LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiology**, 2003, 126:1196–1204.
- GELLATY, K.; MOOHEAD, G. B. G.; DUFF, S. M. G.; LEFEBVRE, D. D; PLAXTON, W. C.. purification of potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosine phosphatase. **Plant Physiology**, 1994, 106, 223-232
- GRANJEIRO, PA; FERREIRA, CV.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M.; AOYAMA, H..Purification and kinetic propeties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl grups. **Physiology Plantarium**, 1999; 107:151-158

- GUPTA R, LUAN S. Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. **Plant Physiology**. 2003; 132(3):1149-1152
- GUO, J.; PESACRETA, J. C.. Purification and characterization of an acid phosphatase from the bulb of *Allium cepa* L. vr. Sweet spanish. **Journal of Plant Physiology**, 1997, 151:520-527.
- GUO, F.Q. OKAMOTO, M., CRAWFORD, N.M. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. **Science**, 2002; 302:100-103.
- HIMMELBACH A, YANG Y, GRILL E. Relay and control of abscisic acid signaling. **Current Opinion in Plant Biology**. 2003; 6(5):470-9
- HU, X, ZHANG, A, ZHANG, J, JIANG, M. Abscisic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress. **Plant Cell Physiology**, 2006, 47(11):1484–1495.
- IBGE. Sistema de Recuperação Automática. Tabela 1612 - **Quantidade Produzida, Valor de Produção, Área Plantada e Área Colhida da Lavoura Temporária.** Disponível em: <
<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1612&z=t&o=10> >
Acesso em: 02 maio 2006
- KAISER, W.M. *et. al.* Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and potentially important side reaction. **Journal of Experimental Botany**, 2002; 53:875-882.
- KATSUHARA, M and SHIBASAKA, M. Cell Death and growth recovery of barley after transient salt stress. **Journal of Plant Research**, 2000; 113:239-243
- KLEPPER LA. Effects of Certain Herbicides and Their Combinations on Nitrate and Nitrite Reduction. **Plant Physiology**. 1979, 64(2):273-275
- KNIGHT, H. AND KNIGHT, M.R.. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, 2001, 6:6, 262-267.
- KOPYRA, M., GWÓZD, A. D.. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2003, 41, 1011-1017.

- LAEMMLI, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970, 227, 680-685.
- LESHEM, Y. Y., WILLS, R.B.H., VENG-VA KU, V.. Evidence for the function of the free radical gas — nitric oxide (NO) — as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. **Plant Physiology Biochemistry.**, 1998, 36, 825-833.
- LI-PING, B, FANG-GONG, S, TI-DA, G, ZHAO-HUI, S., YIN-YAN, L. AND GUANG-SHENG, Z. Effect of Soil Drought Stress on Leaf Water Status, Membrane Permeability and Enzymatic Antioxidant System of Maize. **Pedosphere**, 2006, 16(3):326-332.
- LUAN, S Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. **Trends in Plant Science**, 1998, 3, 271-275.
- MAHALINGAM, R. AND FEDOROFF. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, 2003, 119, 56-68
- MAHAJAN S, TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005, 15;444(2):139-58.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F.O.M.; PAIVA, E. Fisiologia da planta de milho. Sete Lagoas: **EMBRAPA-CNPMS**, 1995. 27 P. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 20).
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F.O.M. Cultivo do milho – Germinação e emergência. **EMBRAPA-CNPMS**, Comunicado técnico 39, 2002
- MAHAJAN, S, TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry Biophysics*. 2005 Dec 15;444(2):139-58
- MERCK BIOSCIENCE.
http://www.merckbiosciences.co.uk/html/cbc/nitric_oxide_donors_precursors.htm#overview. Acessado em 05/09/2007)
- MIERNYK J. A., Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme secreted by maize endosperm cultures, **Phytochemistry**, 1992, 31, 2613-2616.
- MONSOUR M. M. F.; SALAMA, K.H.A., Cellular basis of salinity tolerance in plants. **Environmental and Experimental Botany** , 2004, 52, 113–122

- MORABITO, D.; JOLIVET, Y.; PRAT, D.; DIZENGREMEL, P.. Differences in the physiological responses of two clones of *Eucalyptus micrtheca* selected for their salt tolerance. **Plant Science**, 1996, 114, 129-139.
- MORSY MR, JOUVE L, HAUSMAN JF, HOFFMANN L, STEWART JM. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. **Journal of Plant Physiology**. 2005; 164(2):157-67
- MÜHLING, K. L. AND LÄUCHLI, A. Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance **Journal of Plant Physiology**, 2002, 159: 2, 137-146.
- MURGIA, I., PINTO, M. C., DELLEDONNE, M., SOAVE, C., GARA, L.. Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death and cell redox state in plant cells. **Journal of Plant Physiology**, 2004, 161, 777-783.
- NEILL, S. J., DESIKAN R., HANOCK, J. T.. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells.. **Plant Physiology**, 2003, 128:1, 13-6
- NOCE, M.A. Milho variedade BR106, técnicas de plantio. **EMBRAPA-CNPMS**, Comunicado Técnico, 109, 2004.
- PENHEITER, A. C.; DUFFS. M. G.; SARATH, G. Soybean root nodule and acid phosphatase. **Plant Physiology**, 1997, 114, 597-604.
- PITZSCHKE, A. AND HIRT, H. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. **Plant Physiology**, 2006,141, 351-356.
- PLANCHET, et. al. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. **Plant Journal**, 2005, 41, 732-743.
- PRAZERES, J.N., FERREIRA, C.V. AND AOYAMA, H..Acid phosphatase activities during the germination of *Glicine max* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2003, 42, 15-20.
- PRIMAVESI, A. Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais. 9. ed. São Paulo. **Livraria Nobel**,1996.

- RAVEN, JA, Can plants rely on nitrate? *Trends Plant Science*. 2004; 8(7):314-315.
- REJSKOVÁ A, PATKOVÁ L, STODŮLKOVÁ E, LIPAVSKÁ H. The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology*. 2005; 164(2):174-184.
- RODRÍGUEZ-ZAPATA, L. Z. AND HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, T. S. M. Detection of tyrosine phosphatase activity in *Catharanthus roseus* hairy roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, 1998, 36:10, 731-735.
- ROMERO-PUERTAS, M.C., DELLEDONE, M.. Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. **IUBMB Life**, 2003, 55, 579-583.
- RUBIO-CASAL, A. E.; CASTILLO, J. M.; LUQUE, C. J.; FIGUEROA, M. E. Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean salt pans. **Journal of Arid Environments**, 2003, 53:2, 145-154.
- SALVI, M.; BRUNATI, A. M.; TONINELLO, A.. Tyrosine phosphorylation in mitochondria: A new frontier in mitochondrial signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, 2005, 38, 1267-1277.
- SCHLERETH, A., STANDLHARDT, D., MOCK, H.P., MUNTZ, K. Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axis and cotyledons during vetch (*Vicia sativa*) seed germination. **Planta**, 2001; 212:718–727.
- SENNA, R.. Tirocina fosfatase envolvida na germinação de sementes de milho (*zea mays*). **Dissertação de Mestrado pelo PPGN – IN – UFRJ**, 2003.
- SENNA, R., SIMONIN, V., SILVA-NETO, M. A. C., FIALHO, E. Induction of acid phosphatase activity during germination of maize (*Zea mays*) seeds. **Plant physiology and Biochemistry**. 2006, 44, 467-473.
- SHABALA S, BABOURINA O, NEWMAN I. Ion-specific mechanisms of osmoregulation in bean mesophyll cells. **Journal Experimental Botany**. 1987; 51(348):1243-1253.
- SHEOKAND, S., DAHIYA, P., VINCENT, J.L AND BREWIN, N.J. Modified expression of cysteine protease affects seed germination, vegetative growth and nodule development in transgenic lines of *Medicago truncatula*. **Plant Science**, 2005; 169:966-975

- SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion of Plant Biology**. 2000; 3(3):217-222.
- SHINAMO,T.; YONETNI, R.; USHHARA, N.; ADACHI,, H.; WASAKI, J.; MATSUI, H.; OSAKI, M.. Characteristics of phosphoenolpyruvate phosphatase purified from *Allium cepa*. **Plant Science**, 2001, 161, 861-869.
- SIMONTACCHI, M. et. al.. Nitric oxide during early germination of sorghum seeds. **Plant Science**, 2004, 167, 593-615
- SOKOLOVSKI S, HILLS A, GAY R, GARCIA-MATA C, LAMATTINA L, BLATT MR. Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. **Plant Journal**. 2005; 43(4):520-9
- SOSA L, LLANES A, REINOSO H, REGINATO M, LUNA V. Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. **Annals of Botany**, 2005, 96(2):261-267
- STASWICK, P. E.; PAPA, C.; HUANG, J.; RHEE, Y.. Purification of the major soybean leaf acid phosphatase that increased by seed-pod removal. **Plant Physiology**, 1994, 104, 49-57.
- TABALDI, LA, RUPPENTHAL, R, CARGNELUTTI, D, MORSCH, VM, PEREIRA, LB, SCHETINGER, MRC. Effects of metal elements on acid phosphatase activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. **Enviromental and Expeimental Botany**, 2005.
- TAN-WILSON, AL, LIU, X, CHEN, R, QI, X, WILSON, KA. An acidic amino acid-specific protease from germinating soybeans. **Phytochemistry**. 1996; 42(2):313-9
- TIJSKENS, LM, GREINER, R, BIEKMAN, ES, KONIETZNY, U. Modeling the effect of temperature and pH on activity of enzymes: the case of phytases. **Biotechnology Bioengineering**. 2001, 72(3):323-30.
- TOWBIN, H; STAEHELIN, T; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 1979, 76:4350-4354.

- VELJANOVSKI, V, VANDERBELD, B, KNOWLES, VL, SNEDDEN, WA, PLAXTON, WC. Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiology*. 2006, 142(3):1282-1293
- VICENTE, O, BOSCAIU, M., NARANJO, M.A., ESTRELLES, E., BELLES, J.M, SORIANO, P.. responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). **Journal of Arid Environments**, 2003, 58, 463-481.
- VILLAGRA, P. B.. Germination of *Prosopis argentina* and *P. alpataco* seeds under saline conditions. **Journal of Arid Environments**, 1997, 37, p.261-267.
- WAHOME, P. K.; JESCH, H. H. AND GRITTFNER, I. Mechanisms of salt stress tolerance in two rose rootstocks: *Rosa chinensis* 'Major' and *R. rubiginosa*. **Scientia Horticulturae**, 2001, 87: 3, 207-216.
- WENDEHENNE, D.; LAMOTTE, O.; PUGIN, A.. Plant iNOS: Conquest of the Holly Gray. **Trends in Plant Science**, 2003, 8:10, 465-468
- WOJTASZEK, P. Nitric oxide in plants. To NO or not to NO. *Phytochemistry*. 2000, 54(1):1-4
- XIONG L, SCHUMAKER KS, ZHU JK. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **Plant Cell**. 2002;14 Suppl:S165-83.
- YAMADA M, MORISHITA H, URANO K, SHIOZAKI N, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K, YOSHIBA Y. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. **Journal of Experimental Botany**. 2005; 56(417):1975-1981
- YAMAMOTO A, BHUIYAN MN, WADITEE R, TANAKA Y, ESAKA M, OBA K, JAGENDORF AT, TAKABE T. Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants. **Journal of Experimental Botany**. 2005; 56(417):1785-1796
- YAMASAKI, H. AND SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vivo evidence for NR-dependent formation of active nitrogen species. **FEBS**, 2000, 468, 89-92.

- ZHANG, C.; MCMANUS, M. T.. Identification and characterization of two distinct acid phosphatases in cell walls of roots of whit clover. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2000, 38, 259-270.
- ZHANG, Z.Y.; ZHOU, B.; XIE, L..Modulation of protein kinase by protein phosphatases and inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, 2002, 93:307-317.
- ZHAO, L.; ZHANG, F.; GUO, J.; YANG, Y.; LI, B.; ZHANG, L. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Physiology**, 2004, 134, 849-857.
- ZHENG, Y. AND DURANTI, M. Molecular properties and thermal secretion of lupin seed acid phosphatase. **Phytochemistry**, 1995, 40:1,21-22.

ANEXO

Manuscrito em fase final de preparação a ser submetido para a revista

Journal of Plant Physiology

1 **Short running title:**

2

3 **MAIZE PHOSPHATASE ACTIVITY UNDER SALT STRESS**

4

5

6

7

8

9 **Corresponding author:**

10 Dr. Eliane Fialho

11 Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro,

12 Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Caixa

13 Postal 68041, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, CEP 21941-590,

14 Brasil.

15

16 Phone number: +55 21 2562 6602

17 Fax number: + 55 21 2280 8343

18 e-mail address: elianefialho@yahoo.com.br

19

20

21

22

23

24

25

26

27 **SALT STRESS DECREASE TYROSINE PHOSPHATASE ACTIVITY DURING MAIZE**
28 **GERMINATION**

29 **Vagner Simonin^a, Raquel Senna^b, Mário Alberto Cardoso da Silva-Neto^b and Eliane**
30 **Fialho^{a*}**

31
32
33
34
35 ^a Laboratório de Alimentos Funcionais e Sementes – Departamento de Nutrição Básica e
36 Experimental – Instituto de Nutrição Josué de Castro – Universidade Federal do Rio de
37 Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

38 ^b Laboratório de Sinalização Celular – Instituto de Bioquímica Médica – Universidade
39 Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

40 * Corresponding author

53 **Summary**

54 Crop salt damage is an environmental stress that limits growth and development in plants.
55 In the metabolic processes, the effects of the discharge salinity were not still elucidated
56 totally, however it is told that the reduces the hydration of the seeds and it induces
57 changes in the activity of some important enzymes involved in germination. Phosphatases
58 are believed to be important in plants but its role in adaptation to abiotic stress at
59 germination has not been critically evaluated. To adress this issue, the aim of this work is
60 to compare the tyrosine phosphatase activity, as well as the growth profile under different
61 salt stress during germination of maize seeds. In ours results we observed a decrease at
62 80 % in growth and 90 % on tyrosine phosphatase activity in embryos from 0, 12, 24, 36
63 and 48 h previously soaked with 1.0 M of NaCl, KCl, KI or NaI. In native gel activity we
64 observed a slightly stained of on band of protein when all salt concentrations were
65 increased. The histochemical studies showed a decrease of activity in apical meristeme of
66 embryos in 0.2 M of all salts studied. When we analyses the phosphotyrosine profile we
67 observed a diminish of an intensity of a 14 kDa phosphoprotein band when 0.2M of all
68 salts were utilized. Total proline content showed an increase of 2-fold and total soluble
69 sugars of 4-fold in 0h of germination of 1M of all salts, when compared with without salt
70 embryos. These data suggest that this seed is not salt tolerant at this germination phase of
71 plant growth and tyrosine phosphatase activity can be modulate by different salt stress.

72

73 **Key words:** salinity, organic solutes, tyrosine phosphatase, mineral content, *Zea mays*.

74 **Abbreviations:** BCIP/NBT, Bromo-chloro-indolil-phosphate / Nitro Blue Tetrazolium; FW,
75 fresh weight; KCl, potassium chloride; KI, potassium iodide; NaCl, sodium chloride; NaI,
76 sodium iodide; nmol, nano mols; *p*NPP, *p*-nitrophenylphosphate; *p*NP, *p*-nitrophenol; Pi,
77 inorganic phosphate; SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of
78 sodium dodecyl sulfata.

79 Introduction

80 Salinity represents one of the most important environmental stresses since it limits
81 crop plant production, which is contrary to the increased demand for food all over the world
82 (Monsour and Salama, 2004). Soil salinization trigger soil degradation and these effects
83 are more conspicuous in arid and semi arid areas where 25% of the irrigated land is
84 affected by salts. In northeast of Brazil, 52% of its soil is in the semi-arid tropics and the
85 increase of salt affected soils due poor soil and water management in the irrigated areas,
86 the salinity problem became of great importance for agriculture production in this region
87 (Azevedo-Neto, *et al*, 2004)

88 Many plants develop mechanisms to exclude salt of cells or tolerate its presence
89 within the cells. These mechanisms during salt stress can promote various biochemical
90 and physiological alterations in plants, for example change in carbohydrates and lipids
91 metabolism, diminish of root growth, protein synthesis and photosynthesis (Parida and
92 Das, 2004)

93 Salinity inhibition of plant growth is the result of osmotic and ionic effects and the
94 different plants can developed any mechanisms to ameliorate these effects (Xiong, and
95 Zhu, 2002). One of this mechanism is the accumulation of organic solutes, like proline and
96 soluble sugars, to help towards the maintenance of ionic homeostasis and to removal free
97 radicals frequently increase in plants under salt stress (Misra and Gupta, 2005).

98 Protein phosphorylation and dephosphorylation regulate numerous biological
99 processes and are catalyzed by protein kinases and phosphatases, respectively. These
100 enzymes are classified into two major groups based on their substrate specificity:
101 serine/threonine kinases and serine/threonine phosphatases, which act on both serine and
102 threonine residues; and tyrosine kinases and tyrosine phosphatases, which act on tyrosine
103 residues (Luan, S., 2002).

104 Additionally, our group, in a recently study, identified an acid phosphatase capable
105 to dephosphorylate tyrosine residues in maize embryos during germination. This enzyme
106 showed high affinity for *p*NPP and phosphotyrosine and low affinity for phytic acid. It was
107 also observed, that this enzyme was inhibited strongly by amonium molibidate and sodium
108 vanadate and not inhibited by okadaic acid (Senna, *et. al*, 2006).

109 Maize (*Zea mays* L.) is considered a moderately salt-sensitive plant; however
110 studies about the mechanisms of salt tolerance in maize seeds during germination are
111 very scarce (Zörb, *et. al*, 2004). In plants, the effects of the discharge salinity in the
112 metabolic processes were not totally elucidated and several cellular proteins can be
113 reversely phosphorylated/dephosphorylated, what causes a great interest in to identify and
114 to characterize phosphatases in plants, and the effects of these enzymes in the
115 germination processes. Therefore, the objective of this work is to identify the growth
116 pattern of maize seeds embryos soaked in different concentrations of sodium and
117 potassium chlorides and iodides, as well as, the tyrosine phosphatase activity, a key
118 enzyme involved in proliferation and cellular differentiation.

119 **Materials and Methods**

120

121 **Experimental Design**

122 Maize seeds were soaked for 24 h with different concentration of diverse salts.
123 After, maize seeds were germinated in water for 48 h. Five embryos were colleted
124 measured and homogenized. These homogenates were used for enzymatic assays. We
125 analyzed, phosphatase activity using *p*NPP as a substrate, in gel activity of phosphatase
126 using α -naftyl phosphate as a substrate and phosphoprotein profile analyzed for protein
127 blot using an anti-body against phosphotyrosine proteins. Histochemical analyses of
128 tyrosine phosphatase activity were analyzed in embryos at 24 h of germination using α -
129 naftyl phosphate as a substrate. Osmotic solutes (proline and soluble sugars)

130 accumulation and sodium and potassium content were analyzed using 100 mg of embryos
131 in 0, 24 and 48 h of germination. All quantify data were submitted for One-way ANOVA
132 and Tukey test for statistical analyses.

133

134 **Materials**

135 Maize (*Zea mays*) seeds were kindly provided by Empresa Brasileira de Pesquisa
136 Agropecuária – EMBRAPA (Passa Quatro, MG, Brazil); pNPP and bovine serum albumin
137 were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), molecular weight
138 standards were purchased from BioAgency, BCIP/NBT substrate of alkaline phosphatase
139 was from Promega Corporation (Madison, WI, USA), monoclonal antibody against
140 phosphotyrosine was from Santa Cruz Biotechnology (San Francisco, CA, USA). All other
141 chemicals were of analytical grade.

142

143 **Germination of seeds**

144 Maize (*Zea mays*) seeds were sterilized with 2 % hypochloride solution for 10 min,
145 washed with distilled water three times and soaked for 24 h in water (without salt) or NaCl,
146 KCl, NaI and KI with different concentrations (0.02, 0.2, 0.5 and 1.0 M). Then, the seeds
147 were germinated in the dark at room temperature on filter paper and embryos were
148 harvested during 48 h at intervals of 12 h. Lots of five embryos were homogenized and
149 assayed.

150

151 **Total homogenate preparation and Protein estimation**

152 The germinated embryos were homogenized in 0.1 M sodium acetate buffer (pH
153 5.0). The homogenate was centrifuged at 12,000 G for 5 min. The pellets were discarded
154 and supernatants were used for assays, described as total homogenate. These

155 homogenates were frozen at -18 °C until analysis. All the experiments are the average of
156 three independent assays using different batches of maize seeds.

157 Total protein concentration was determined by Coomassie blue G-250 dye binding
158 using bovine serum albumin as standard (Bradford,1976).

159

160 **Determination of *p*-nitrophenol formation**

161 Enzyme assays to determine the phosphatase activity during germination, time
162 course and substrate curve were run in 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) and 2 mM *p*NPP as
163 substrate and total homogenates in a final volume of 0.15 mL at 37 °C. Assays were
164 conducted in plastic 96-well microtiter plates. The reactions were stopped by addition of 1
165 N NaOH, and *p*-nitrophenol absorbance was measured at 405 nm in a microplate reader
166 (Thermomax). The extinction coefficient for *p*-nitrophenolate ion ($1.75 \mu\text{M} \times \text{cm}^{-1}$) was
167 utilized for determination of the enzyme specific activity. The results were expressed in
168 nmols *p*NP x mg ptn⁻¹ x min⁻¹.

169

170 **SDS-PAGE and protein gel blot analysis**

171 Total proteins (0.04 mg) from embryos homogenates were separated by SDS-
172 PAGE. Polyacrylamide gels (10×10×0.1cm, 10% acrylamide) were run in the presence of
173 SDS (Laemmli, 1970) at a constant current of 15 mA. Gels were stained with Coomassie
174 blue and dried. Protein gel blot analysis was performed as follows. Gels were transferred
175 to a nitrocellulose membrane at 190 mA for 90 min. Membranes were blocked with 5 %
176 albumin and then probed with 1:1000 dilution of a mouse monoclonal anti-phosphotyrosine
177 PY-99 and developed by BCIP/NBT, a stabilized substrate for alkaline phosphatase. Other
178 experimental conditions are described in (Towbin *et al.*, 1979).

179

180

***In situ* activity of tyrosine phosphatase**

181
182 Histochemical studies of embryo content in 24 hours of germination were realized in
183 fresh sections. The samples were assembled in Tissue-Tek (O.C.T. Compound) shaping a
184 block. Sections were done in a cryostat (IEC CTF Microtomo-Cryostat) at - 30 °C in 12 –
185 16 µm sections of thickness. Sections were incubated for 60 minutes at 37 °C in different
186 conditions: 1) in the presence of 0.1 M Tris-HCl pH 6.0, 1 mg ml⁻¹ Fast Blue BB, 2) 0.1 M
187 Tris-HCl pH 6.0, 1 mg ml⁻¹ Fast Blue BB, 0.1 M α-naftyl phosphate and, 3) 0.1 M Tris-HCl
188 pH 6.0, 1 mg.ml⁻¹ Fast Blue BB, 0.1 M α-naftyl phosphate and phosphatase cocktail
189 inhibitor (0.1 mM ammonium molybdate, 0.1 mM sodium vanadate). After this, the sections
190 were washed with 0.1 M This-HCl pH 6.0 and photographed with a camera coupled in an
191 optic microscopy.

In gel activity of tyrosine phosphatase

192
193
194 Total proteins (0.04 mg) from embryo homogenates were separated by
195 polyacrylamide gels as describe above in the absence of SDS. These assays was follow
196 by protocol of Biwas et al (1996), with some modifications, where gels were stained for
197 phosphatase activity, in 37 °C for 60 min, with 0.1 M Tris-HCl pH 6.0, 1 mg.ml⁻¹ Fast Blue
198 BB and 0.1 M α-naftyl phosphate, as a substrate. The control gels were stained with 0.1 M
199 Tris-HCl pH 6.0 + 1 mg ml⁻¹ Fast Blue BB or 0.1 M Tris-HCl pH 6.0 + 1 mg ml⁻¹ Fast Blue
200 BB + 0.1 M α-naphthyl phosphate and phosphatase cocktail inhibitor (0.1 mM ammonium
201 molybdate, 0.1 mM sodium vanadate).

Osmotic solutes determination

202
203
204 Proline was measured as described by Bates *et al.* (1973). 0.1 g of frozen maize
205 embryos was homogenized in 1.5 mL of 3 % sulphosalicylic acid and the residue was
206 removed by centrifugation. 0.1 ml of the extract was reacted with 2 mL glacial acetic acid

207 and 2 mL acid ninhydrin (1.25 g ninhydrin warmed in 30 mL glacial acetic acid and 20 mL
208 of 6M phosphoric acid until dissolved) for 1 h at 100 °C and the reaction was stopped in
209 an ice bath. The reaction mixture was extracted with 1 mL toluene. The chromophore
210 contained in toluene was warmed to room temperature and its optical density was
211 measured at 520 nm. The amount of proline was determined from a standard curve in the
212 range of 20 – 100 mg.

213 The soluble sugars were extracted using the protocol previously described by Ciha
214 and Brun, 1978, where 100 mg of frozen maize embryos was homogenized in 10 mL of
215 extraction buffer (Acetic acid:methanol:water, 1:4:5, v/v/v). This homogenate was
216 centrifuged for 10 min at 12,000 G and the supernatant was reserved. The pellet was
217 resuspended in 10 mL of extraction buffer and centrifuged for 10 min at 12,000 G. The
218 supernatant was reserved and added in other obtained supernatant described above. The
219 volume was corrected for 50 mL with deionized water. For the measurement of soluble
220 sugars we utilized the protocol previously described by Dubois *et. al.*, 1956, where 500 µl
221 of extract was added in a solution containing 5% phenol in 2.5 mL of glacial acid acetic.
222 The reaction occurs for 20 min in 90 °C in a shaker bath. These reactions were stopped in
223 iced bath and the optical absorbance was read at 490 nm in spectrophotometer. The
224 amount of glucoses was determined from a standard curve in the range of 0.1 – 1.0 mg

225

226 **Statistical Analysis**

227 One-way analysis of variance was applied to the data to evaluate the salt-effect.

228 Mean values and significance were determined by Tukey test at $p \leq 0.05$.

229

230 **Results**

231

232 **Embryo growth during *Z. mays* seeds germination under salt stress**

233 The NaCl and KCl treatment led to a decrease in embryos size of maize seeds
234 while no significant growth effect was found (Figure 1 A and B). A significant reduction of
235 embryos growth was already found at 0.2 M of NaCl or KCl (Figure 1 A and B) and in 0.02
236 M of NaI or KI (Figure 1 C and D) at 24 h of germination.

237

238 **Phosphatase activity during *Z. mays* seeds germination under salt stress**

239 Acid phosphatase activities were measured using pNPP as synthetic substrate and
240 total seed homogenates obtained at different times during germination.

241 When phosphatase was assayed in homogenates of maize seeds embryos
242 obtained from different hours after being soaked, we noticed that during germination, there
243 was an increase in phosphatase activity after 24 h in control (without salt) and 0.02 M of all
244 salts studied. However when salt concentration was higher, with concentrations upper 0.02
245 M the phosphatase activity was decrease at basal levels (Figure 2). When total
246 homogenates from 24 h of maize seed embryos were assayed in the presence of different
247 salts, we observed that tyrosine phosphatase activity was not influenced directly by these
248 salts (data not shown).

249 In addition phosphate content was measured in embryos of all salts concentrations
250 analysed and in control sample at 0, 24 and 48h of germination These data showed an
251 increase of a Pi content in total homogenates when phosphatase activity was higher,
252 although in salt embryos that phosphatase activity was in basal levels the Pi content was
253 also in basal levels (data not shown).

254 Phosphatase activity was visualized in native gel stained with α -naphityl phosphate
255 and fast blue, we noticed an increase of band intensity in control, 0.02M and 0.2M of NaCl
256 or KCl, however in NaI and KI we only observed this result in 0.02M (Figure 3).

257 Phosphatase activity was analysed by histochemical assays of embryos with 24 h of
258 germination realized in fresh sections with α -naftyl phosphate as a substrate for tyrosine

259 phosphatase (Figures 4). Control experiments were incubated under the same conditions
260 without substrate (Figures 4). It was observed in control embryos and in 0.02M of all salts
261 studied a red staining in the regions of root apical meristem, coleoptile and first leaves
262 (arrows), this staining was abolished when the reaction was done in the presence of
263 phosphatase cocktail inhibitors (0.1 mM sodium vanadate, 0.1 mM ammonium molybdate)
264 (Figures 4). In the others concentrations we not observed this staining.

265

266 **Phosphotyrosine profile during *Zea mays* seed germination under salt stress**

267 Total embryos homogenates obtained at 0 and 24 h of germination were analyzed
268 by immunoblotting to observe phosphotyrosine-containing proteins. As shown in Figure 5,
269 tyrosine-phosphorylated proteins were detected. A 14 kDa protein was a major
270 phosphotyrosine-containing protein in total homogenates. In the control (without salt)
271 (Figure 5 A) and in NaCl (Figure 5 B), KCl (Figure 5 C), NaI (Figure 5 D) and KI (Figure 5
272 E) 0.02 M, it is clearly shown that germination triggered a dramatic decrease in the
273 intensity of 14 kDa phosphoprotein. In NaCl (Figure 5 B), KCl (Figure 5 C), NaI (Figure 5
274 D) and KI (Figure 5 E) 0.2 M and 1.0 M this decrease was not observed.

275

276 **Osmotic solutes content during *Z. mays* seeds germination under salt stress**

277 To verify whether salt stress modify the internal solutes content, the proline and
278 soluble sugars were measured. During germination had a diminish of total content og
279 osmolites mensureds, independently of salt presence or concentration.

280 However, we observed an increased approximately 2-fold in proline content and 4-
281 fold in soluble sugars in 0 h of germination essentially at 0.2, 0.5 and 1.0 M of all salts
282 studied. Although these differences were more evident in 48 h of germination in these salts
283 concentrations, the results showed an increase of 2-fold in proline and 10-fold in soluble

284 sugars. These results were not observed in 0.02M concentration of salts and the control
285 (without salt) (Table 1).

286

287 **Discussion**

288 All salts enraged a deleterious effect in maize germination, mainly in concentrations
289 between 0.2 and 1.0M. Probably this harmful action was in the first time for the osmotic
290 effect and in the second for the increase of the ionic toxicity (Mühlin and Läuchli, 2002).
291 High salinity provokes reduction in the cellular wall turgor, disabling, thus, the growth and
292 the cellular division (Neves-Piestun and Bernstein, 2001).

293 In accordance with Mühling and Läuchli (2001) a model for reply of the growth in
294 plants when it was submitted by high salinity, was characterized, first for the reduction of
295 the growth for osmotic effect and later, in phases of more delayed development (as leaf
296 appearance) for induced effect for the ionic toxicity, that can provoke, for example,
297 necrosis in leaf tissue

298 The adaptation in low concentrations of salt was possibly for some adaptatives
299 mechanisms activation such as: membrane H⁺ ATPase activation (Babakov *et al.*, 2000),
300 synthesis of osmoprotector (Russel *et al.*, 1998), increase of the Na⁺/H⁺ ATPase activity,
301 increasing the efflux of Na⁺ (Rodriguez-Navarrese and Serrano, 2001, Xia *et al.*, 2002),
302 beyond the activation of kinases summoned on the saline stress protection, as the MAPK
303 and calcium dependents proteins kinases (Kanhonou *et al.*, 2001, Deferred, *et al.*, 2002).

304 Tyrosine phosphatase activity was diminished when NaCl, KCl, NaI and KI was
305 added in soaker water. This result was linked at the fact that this enzyme can be sensed
306 directly by key signaling proteins such as a tyrosine phosphatase through oxidation of
307 conserved cysteine residues (Xiong, *et al.*, 2002). Earlier studies have shown that
308 activation of plant MAPKs also cor-relates with phosphorylation of tyrosine residue(s). A
309 detailed biochemical analysis made for Huang, *et al.* (2000) confirms that a plant MAPK

310 (AtMPK4) is phosphorylated at a tyrosine residue during activation process.
311 Dephosphorylation of the phosphotyrosine by AtPTP1, a tyrosine-specific PTP from
312 Arabidopsis(1), resulted in the loss of MAPK activity. This study demonstrates that tyrosine
313 phosphorylation is essential for the activation of plant MAPKs (Huang, *et al.*, 2000). These
314 enzymes are activate by salt stress at different times after the onset of stress, and the
315 activities of these MAPKs (an enzyme is involved in recuperation of deleterious effects in
316 plant caused by salinity) also last for different time periods (Mikolajczyk *et al.*, 2000).

317 In a study of Liao group (Liao *et al.*, 2003), they show an increased of synthesis of a
318 purple acid phosphatase gene (GmPAP3) in soybean under NaCl stress, these results
319 suggest that the physiological role of GmPAP3 might be related to the adaptation of
320 soybean to NaCl stress, possibly through its involvement in reactive oxygen species
321 forming and/or scavenging or stress-responding signal transduction pathways

322 Osmolites solutes are important for plant adaptation in salinity. Ours results showed
323 an increase of proline and soluble sugars content in 0.2, 0.5 and 1.0 M of all salts studied
324 and in 0.02 M the osmolites contents showed the same profile obtained from samples
325 without salt. These results are in concordance with the data of Khedr *et al.*, 2003, where
326 was showed that salt-stress brought about a reduction of the growth, particularly at 300
327 mM NaCl, that was significantly increased by exogenous proline (Khedr *et al.*, 2003).

328 This study showed that exposure of the maize seeds to increased concentrations of
329 NaCl, KCl, NaI or KI enhanced retard of embryos growth concomitantly with the inhibition
330 of tyrosine phosphatase activity and osmolites acumulation. Observing these results we
331 hypothesize that impact of salt exposure linked of a decrease of tyrosine phosphatase
332 activity was deleterius for maize seeds in this phase of germination, and these seeds were
333 not salt tolerants at this phase.

334

335 **Acknowledgments**

336 This work was supported by grants from Fundação Universitária José Bonifácio
337 (FUJB) – Prêmio Antonio Luís Vianna 2001; Conselho Nacional de Desenvolvimento
338 Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
339 Superior (CAPES); and Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho do Estado
340 do Rio de Janeiro (FAPERJ). The authors are grateful to Dr. Hatisaburo Masuda, Dr. Katia
341 Calp Gondim and Dr. Georgia Corrêa Atella from the Instituto de Bioquímica Médica –
342 IBqM – UFRJ for the use of their laboratories and for partially supporting the research work
343 described in this article.

344

345 **References**

- 346 1. Azevedo-Neto, AD, Prisco, JT, Enéas-Filho, J, Lacerda, CF, Silva, JV, Costa, PHA,
347 Gomes-Filho, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and
348 solute accumulation of different maize genotypes. *Brazilian Journal of Plant
349 Physiology*, 2004, 16:31-38
- 350 2. Babakov, AV, Chelysheva, VV, Klychnikov, OL, Zorinyanz, SE, Trofimova, MS, De
351 Boer, AH. Involvement of 14-3-3 proteins in the osmotic regulation of H⁺-ATPase
352 in plant membranes. *Planta*, 2000, 211:446-448.
- 353 3. Bates, LS, Waldern, RP, Teare, ID. Rapid determination of free proline for water stress
354 studies. *Plant and Soil*, 1973, 39:205–207.
- 355 4. Biswas, TK, Promo, M, Biswas, B. Purification of acid phosphatase I from germinating
356 seeds of *Vigna sinensis*. *Phytochemistry*, 1996, 41:6, 1457-1458.
- 357 5. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram
358 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical
359 Biochemistry*, 1976, 72, 248-257.

- 360 6. Dubois, M, Gilles, G, Hammiton, JK, Rebers, PA, Smith, F. A colorimetric method for
361 the stimations of sugars and related substances. Annalitical Biochemistry, 1956,
362 28:350-356.
- 363 7. Huang, Y, Li, H, Gupta, R, Luan, S, Kieber, JJ. ATMPK4, an Arabidopsis Homolog of
364 Mitogen-Activated Protein Kinase, Is Activated in Vitro by AtMEK1 through
365 Threonine Phosphorylation. Plant Physiology, 2000, 122, 1301–1310.
- 366 8. Kanhounou, R.; Serrano, R.; Palau, R. R.. A catalitic subunit of the sugar beet protein
367 kinase CK2 is induced by salt stress an increases NaCl tolerance in
368 *Saccharomyces cerevisiae*, Plant Mol. Biol., 2001, 47, 571-579.
- 369 9. Khedr, AHA, Abbas, MA, Wahid, AAA, Quick, WP and Abogadallah, GM. Proline
370 induces the expression of salt-stress responsive proteins and may improve the
371 adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt-stress. Journal of Experimental
372 Botany, 54, 392:2553–2562, 2003
- 373 10. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
374 bacteriophage T4. Nature, 1970, 227, 680-685.
- 375 11. Liao, H, Wong, F. L., Phang, T. H., Cheung, M. Y., Li, W. Y. F., Shao, G., Yan, X. and
376 Lam, H. M.. GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean
377 induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. Gene, 2003, 318, 30:103-
378 111.
- 379 12. Luan, S. Tyrosine phosphorilation in plant cell signaling. PNAS, 2002, 99. 18:11467-
380 11569.
- 381 13. Misra, N., Gupta, A. K.. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding
382 genotypes of green gram. Plant Science, 2005, 169, 331–339.
- 383 14. Mikolajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszynska, G., Klessig, G. F., and Dobrowolska, G.
384 Osmotic Stress Induces Rapid Activation of a Salicylic Acid–Induced Protein

- 385 Kinase and a Homolog of Protein Kinase ASK1 in Tobacco Cells. *Plant Cell*, 2000;
386 12:165-178.
- 387 15. Neves-Piestun, B. G.; Bernstein, N.. Salinity-induced inhibition of leaf elongation in
388 maize is not mediate by changes in cell wall acidification capacity. *Plant*
389 *Physiology*, 2001, 125, 1419-1428.
- 390 16. Parida, A. K. And Da, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicology*
391 *and Environmental Safety*, 2005, 60, 324–349
- 392 17. Russell, B. L., Rathinasabapathi, B.; Hanson, A. D.. Osmotic stress induces expression
393 of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiology*, 1998,
394 116, 859-865.
- 395 18. Senna, R., Simonin, V., Silva-Neto, M. A. C., Fialho, E. Induction of acid phosphatase
396 activity during germination of maize (*Zea mays*) seeds. *Plant physiology and*
397 *Biochemistry*. 2006, 44, 467-473.
- 398 19. Serrano, R.; Rodriguez-Navarro, A.. Íon homeostasis during salt stress in plants.
399 *Current opinion of Cell Biology*, 2001, 13, 399-404.
- 400 20. Xia, T.; Apse, M. P., Aharon, G. S.; Blumwald, E.. Identification and characterization of
401 NaCl-induible vacuolar N^+ / H^+ antipoter in *Beta vulgaris*, *Physiology Plantae*,
402 2002, 116, 206-212.
- 403 21. Xiong, L., Schumaker, K. S., Zhu, J. K.. Cell Signaling during cold, drought and salt
404 stress. *The Plant Cell*, 2002, Supplement:165:183.
- 405 22. Xiong, L., Zhu, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic
406 stress. *Plant Cell Environment*, 2002, 25, 131–139.
- 407 **23.** Zörb, C.; Schmitt, S.; Neeb, A., Karl, S.; Linder, M.; Schubert, S. The biochemical
408 reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by mitigation of
409 symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Science*, 2004, 167, 91-100

Tables

Table 1: Osmotic solutes in maize seeds embryos under salt stress

| Samples | 0 h | | 24 h | | 48 h | | |
|---------|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------|
| | Proline ¹ | Soluble Sugars ² | Proline ¹ | Soluble Sugars ² | Proline ¹ | Soluble Sugars ² | |
| Control | 0.59 ±0.01 | 34.88 ±1.035 | 0.52 ±0.02 | 21.86 ±2.87 | 0.32 ±0.035 | 4.79 ±0.165 | |
| NaCl | 0.02 M | 0.65 ±0.01 | 37.62 ±0.415 | 0.61 ±0.015 | 24.05 ±1.335 | 0.34 ±0.01 | 7.96 ±0.32 |
| | 0.2 M | 1.22 ±0.035 | 51.95 ±3.325 | 1.02 ±0.02 | 37.50 ±0.460 | 0.84 ±0.105 | 24.77 ±0.020 |
| | 0.5 M | 0.97 ±0.03 | 128.62 ±0.415 | 0.91 ±0.015 | 68.58 ±0.325 | 0.70 ±0.07 | 41.19 ±2.010 |
| | 1.0 M | 1.04 ±0.065 | 142.39 ±0.115 | 0.77 ±0.06 | 85.57 ±5.155 | 0.70 ±0.075 | 44.69 ±1.780 |
| KCl | 0.02 M | 0.71 ±0.045 | 28.37 ±0.540 | 0.73 ±0.04 | 17.61 ±1.525 | 0.31 ±0.03 | 8.57 ±0.545 |
| | 0.2 M | 1.08 ±0.035 | 41.42 ±3.85 | 0.67 ±0.015 | 28.93 ±4.225 | 0.45 ±0.025 | 24.40 ±1.070 |
| | 0.5 M | 1.23 ±0.025 | 104.42 ±4.040 | 0.87 ±0.025 | 64.72 ±2.270 | 0.60 ±0.03 | 38.72 ±0.955 |
| | 1.0 M | 1.15 ±0.02 | 136.66 ±0.930 | 0.85 ±0.03 | 87.99 ±2.375 | 0.30 ±0.035 | 42.22 ±1.505 |
| NaI | 0.02 M | 0.75 ±0.02 | 35.07 ±0.390 | 0.72 ±0.05 | 26.50 ±1.410 | 0.45 ±0.03 | 15.07 ±4.252 |
| | 0.2 M | 1.04 ±0.055 | 67.25 ±1.485 | 0.64 ±0.035 | 39.72 ±1.150 | 0.41 ±0.015 | 28.26 ±1.350 |
| | 0.5 M | 1.14 ±0.025 | 129.03 ±1.690 | 0.81 ±0.05 | 104.62 ±6.040 | 0.52 ±0.01 | 58.90 ±1.190 |
| | 1.0 M | 1.51 ±0.04 | 140.99 ±2.140 | 0.94 ±0.025 | 94.08 ±2.065 | 0.41 ±0.015 | 70.64 ±2.300 |
| KI | 0.02 M | 0.69 ±0.04 | 33.87 ±0.205 | 0.57 ±0.015 | 14.40 ±2.590 | 0.55 ±0.025 | 7.72 ±0.625 |
| | 0.2 M | 1.04 ±0.04 | 86.24 ±1.585 | 0.89 ±0.01 | 47.66 ±1.225 | 0.66 ±0.025 | 28.30 ±1.065 |
| | 0.5 M | 1.24 ±0.04 | 138.36 ±1.430 | 0.95 ±0.03 | 86.75 ±1.310 | 0.68 ±0.03 | 61.66 ±1.595 |
| | 1.0 M | 1.31 ±0.02 | 161.15 ±4.505 | 0.98 ±0.05 | 128.94 ±6.350 | 0.78 ±0.03 | 97.28 ±3.775 |

All results are showed as mean and ± SE

¹ These results were represented in nmol of proline . g FW⁻¹

² These results were represented in mol of soluble sugars . g FW⁻¹

Legends of Figures

Figure 1: Growth index of embryos of maize seeds under salt stress

The seeds were soaked for 24h in water (without salt) or NaCl (A), KCl (B), NaI (C) and KI (D) with different concentration (0.02, 0.2, 0.5 and 1.0 M). The growth of embryos was measured with milimetric rule. Values are means \pm SE of three independent experiments.

Figure 2: Phosphatase activity in embryos of maize seeds under salt stress

The seeds were soaked for 24h in water (without salt) or NaCl (A), KCl (B), NaI (C) or KI (D) with different concentration (0.02, 0.2, 0.5 and 1.0 M). Phosphatase activity was measured using pNPP as a substrate. Values are means \pm SE of three independent experiments

Figure 3: In gel activity of tyrosine phosphatase

The seeds were soaked for 24h in water (without salt) or NaCl (A), KCl (B), NaI (C) or KI (D) with different concentration (0.02, 0.2, 0.5 and 1.0 M) and after this time maize embryos were collected at 0 and 48 h. 1- 0 h of control (without salt), 2- 48 h of control, 3- 0 h of 0.02 M, 4- 48 h of 0.02 M, 5- 0 h of 0.2 M, 6- 48h of 0.2 M, 7- 0 h of 1.0 M and 8- 48 h of 1.0 M. 0.04 mg of total protein from total homogenates were separated in native PAGE and stained with Fast Blue BB 1 mg.ml⁻¹ and α -naphthil phosphate 0.1mM as a phosphatase substrate.

Figure 4: In situ activity of tyrosine phosphatase

The seeds were soaked for 24h in water (without salt) or 0.2 M of NaCl (A), KCl (B), NaI (C) or KI (D) with different concentration and after this time maize embryos were collected at 24 h. The cuts between 12 and 16 nm of thickness were incubate for 60 min at 37 °C with 0.1 M Tris-HCl pH 6.0 buffer (1) or (2) 0.1 M Tris-HCl pH 6.0 buffer + Fast Blue BB 1 mg ml⁻¹ + α -naphtil phosphate 0.1 mM or 0.1 M Tris-HCl pH 6.0 buffer + Fast Blue BB 1 mg ml⁻¹ + α -naphtil phosphate 0.1 mM + tyrosine phosphatase inhibitor (0.1 mM sodium vanadate and 0.1 mM amonium molibidate) (3). The activity was showed when the microscopy was stained with red color.

Figure 5: Immunological detection of proteins phosphorylated on tyrosine residues during maize seed germination.

The seeds were soaked for 24h in water (without salt) or NaCl (A), KCl (B), NaI (C) or KI (D) with different concentration (0.02, 0.2, 0.5 and 1.0 M) and after this time maize embryos were collected at 0 and 48 h. 1- 0h of control (without salt), 2- 48 h of control, 3- 0 h of 0.02 M, 4- 48 h of 0.02 M, 5- 0 h of 0.2 M, 6- 48 h of 0.2 M, 7- 0 h of 1.0 M and 8- 48h of 1.0 M. 0.04 mg of protein of total homogenates from different germination times were subjected to SDS-PAGE using a separating gel concentration of 10 % according to the method of Laemmli (1970). The gel was blot-transferred to a nitrocellulose membrane and reacted with anti-phosphotyrosine monoclonal antibody.

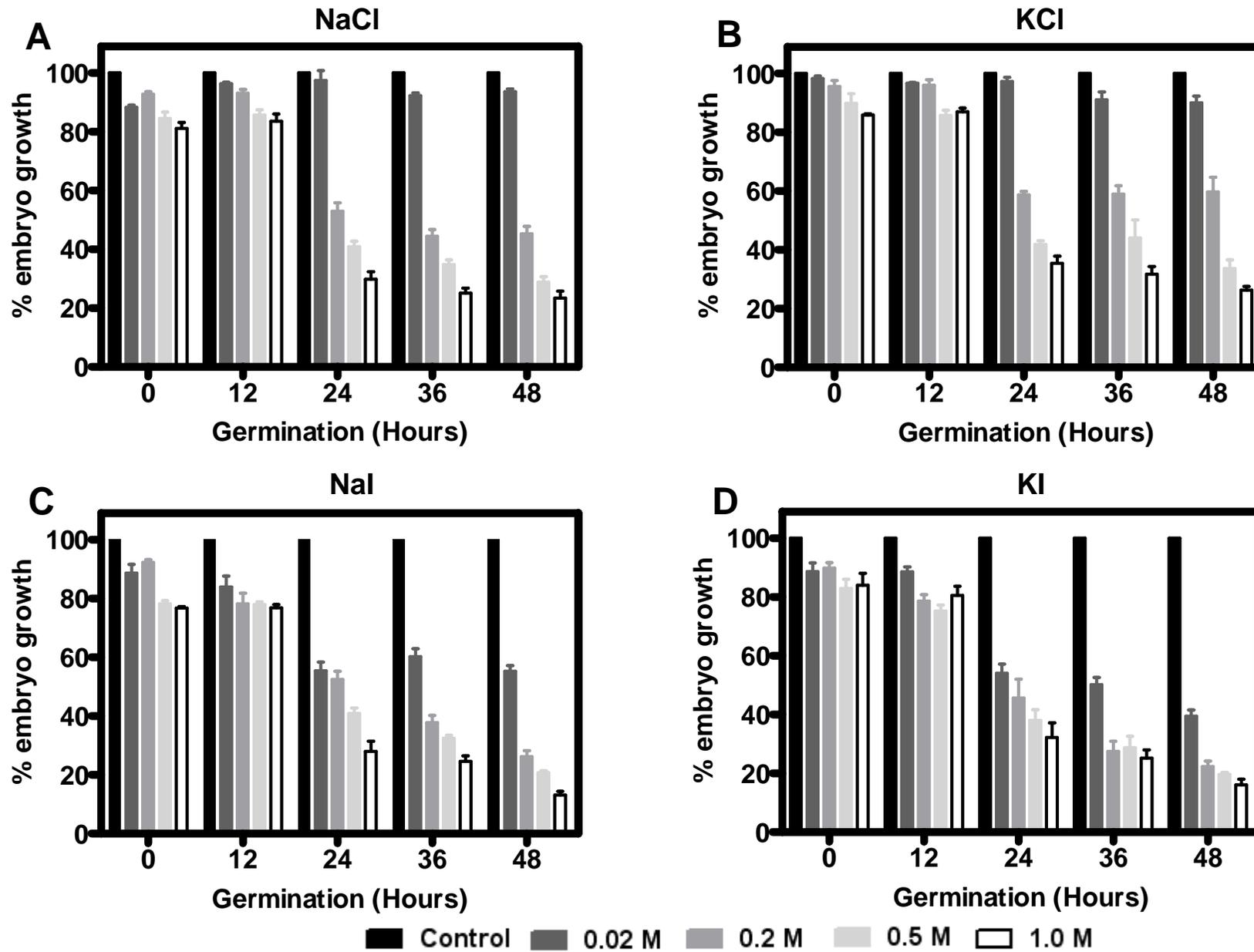


Figure 1
Simonin et al. 2007

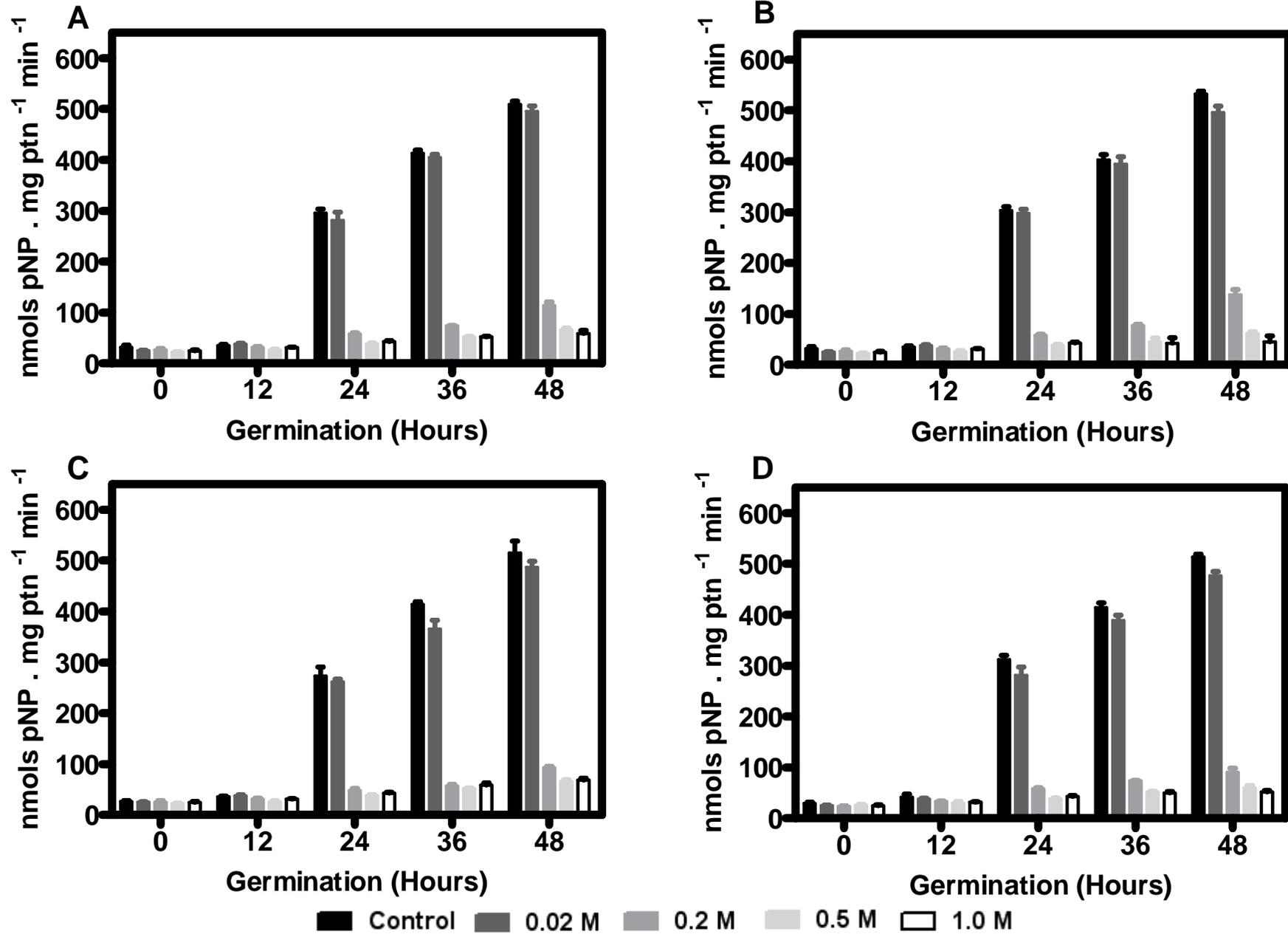


Figure 2
Simonin *et al.* 2007

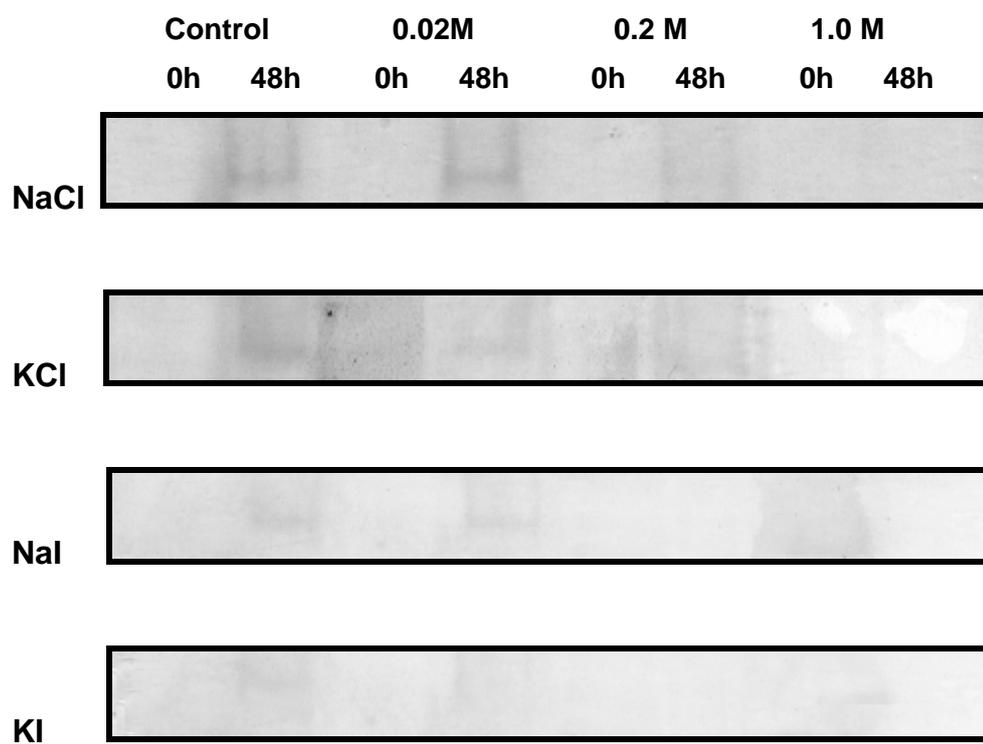


Figure 3
Simonin *et al.* 2007

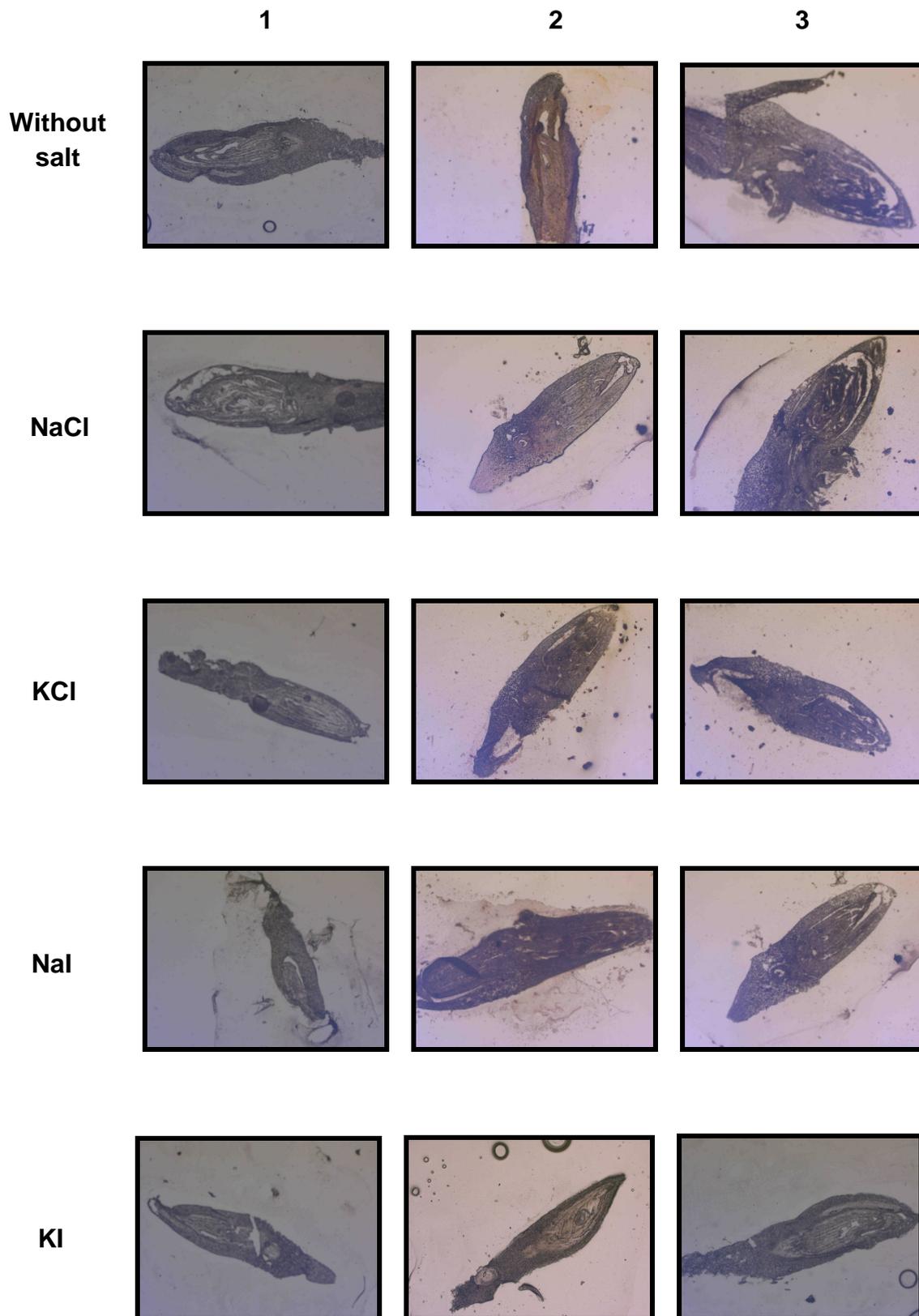


Figure 4
Simonin *et al.* 2007

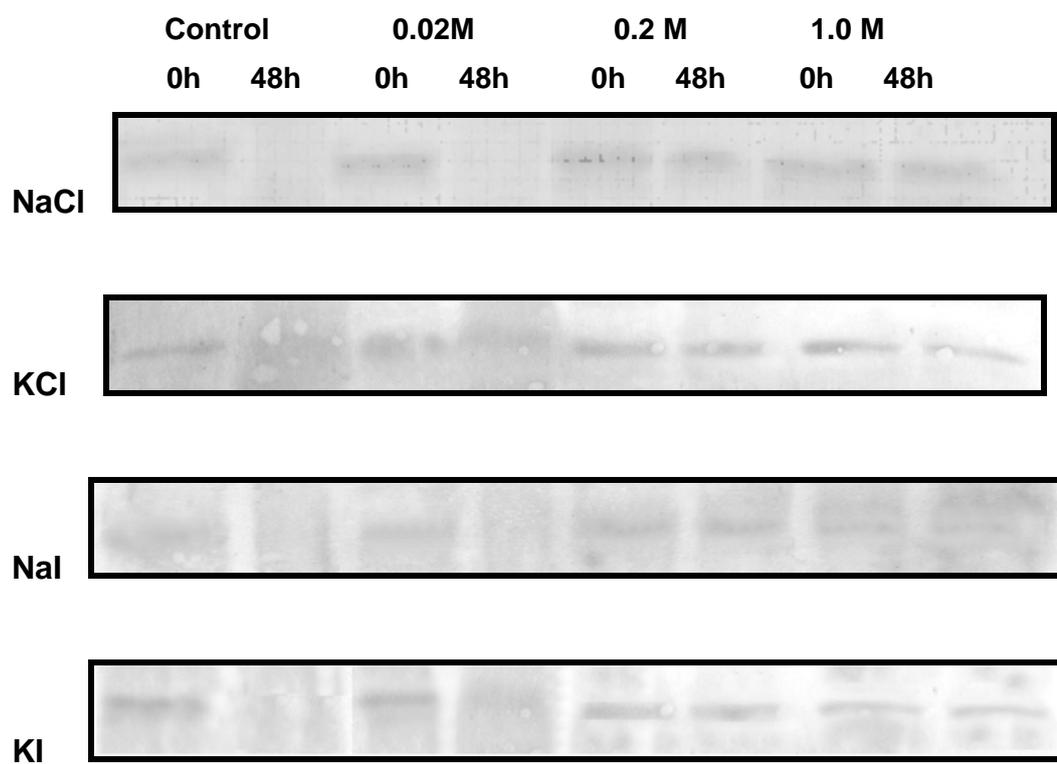


Figure 5
Simonin *et al.* 2007

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)