

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise bioquímica do mutante hormonal de tomateiro *Never ripe (Nr)*  
submetido aos estresses por cádmio e salinidade**

**Carolina Cristina Monteiro**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e  
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba  
2010**

**Carolina Cristina Monteiro**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Análise bioquímica do mutante hormonal de tomateiro *Never ripe (Nr)* submetido aos estresses por cádmio e salinidade**

Orientador:  
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba**  
**2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Monteiro, Carolina Cristina

Análise bioquímica do mutante hormonal de tomateiro *Never ripe (Nr)* submetido aos estresses por cádmio e salinidade / Carolina Cristina Monteiro. - - Piracicaba, 2010.  
120 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.  
Bibliografia.

1. Antioxidantes 2. Cádmio 3. Enzimas 4. Estresse oxidativo 5. Mutação vegetal  
6. Salinidade 7. Tomate I. Título

CDD 635.642  
M775a

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

Aos meus pais, Carlos e Elizabete,  
Às minhas irmãs, Debora, Patrícia e Juliana,  
Ao meu sobrinho Rogério,  
que jamais mediram esforços  
para que eu chegasse até aqui  
D E D I C O

Ao meu querido Tiago,  
por toda paciência, amor  
e companheirismo,  
fundamentais para essa conquista  
O F E R E Ç O



## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo nos primeiros meses de trabalho e a Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro com bolsa (2008/52395-0) e auxílio à pesquisa (2004/08444-6);

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela estrutura oferecida;

Aos meus pais, por me incentivarem todos os dias e me ajudarem a realizar meus sonhos;

Ao meu querido Tiago, por estar sempre ao meu lado, tanto nos bons momentos quanto nas horas difíceis. Eu lhe agradeço por tudo;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela orientação, oportunidade, confiança e apoio ao longo destes anos, e a Jacqueline, pela amizade e apoio. Muito obrigada;

Em especial a Pri, pelo companheirismo, a paciência, a amizade, a força, compreensão! Por todos os passos que demos juntas desde o início do desenvolvimento deste trabalho, por todas as vitórias que conquistamos juntas. Pri, muito obrigada por ser minha amiga e irmã;

À Salete, pelas sugestões e contribuições no trabalho, e pelos momentos em que me deu atenção quando precisei;

Às amigas Gicka, Mariana, Aline, Leila, Daiana, Milca e Mônica por toda ajuda na realização desse trabalho e pelas boas conversas que tivemos;

Aos amigos do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas: Flávia, Rogério, Luciana, Bertha, Paula e Laís, pela convivência e apoio

Ao Léo pelas discussões sobre o trabalho desde o início, ajuda na análise estatística e muita paciência comigo;

Ao Prof. Dr. Lázaro E. P. Peres pelo apoio e contribuições desde o início do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Tiago Tezotto pela amizade e grande ajuda nas quantificações de Na e Cd;

Ao Prof. Dr. Cassio Hamilton Abreu Junior e a Cleusa Pereira Cabral pela ajuda com as digestões dos materiais vegetais e quantificações de sódio;

Ao Prof. Dr. Francisco José Krug e a Iolanda Aparecida Rufini pela ajuda nas quantificações de Cd;

Aos amigos e colegas da República Piket e da Capim Canela, pelos momentos de confraternização;

Aos professores e funcionários do Programa;

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO .....  | 11 |
| ABSTRACT .....  | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 17 |
| 2.1 O tomateiro como modelo de estudos biológicos.....                      | 17 |
| 2.2 Mutantes hormonais em tomateiro .....                                   | 17 |
| 2.2.1 O mutante hormonal de tomateiro <i>Never ripe (Nr)</i> .....          | 18 |
| 2.2.2 Biossíntese de etileno .....  | 19 |
| 2.3 Estresse oxidativo em plantas.....                                      | 20 |
| 2.4 Salinidade em plantas .....   | 22 |
| 2.5 Cádmió .....  | 23 |
| 2.6 Mecanismos de defesa em resposta ao estresse oxidativo em plantas ..... | 25 |
| 2.6.1 Superóxido dismutase (SOD) .....                                      | 27 |
| 2.6.2 Catalase (CAT).....   | 28 |
| 2.6.3 Glutathione redutase (GR).....  | 29 |
| 2.6.4 Ascorbato peroxidase (APX).....                                       | 31 |
| 2.6.5 Guaiacol peroxidase (GPOX).....                                       | 32 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 35 |
| 3.1 Materiais biológicos .....  | 35 |
| 3.2 Experimento básico .....  | 35 |
| 3.2.1 Vasos Leonard .....   | 37 |
| 3.3 Matéria seca.....   | 37 |
| 3.4 Determinação de clorofila por SPAD.....                                 | 37 |
| 3.5 Extração de proteínas .....   | 38 |
| 3.6 Determinação de proteínas .....   | 38 |
| 3.7 SDS-PAGE.....   | 39 |
| 3.8 Peroxidação de lipídeos.....  | 40 |
| 3.9 Conteúdo de peróxido de hidrogênio .....                                | 40 |
| 3.10 Atividade das enzimas antioxidantes.....                               | 41 |



|   |    |
|---|----|
| 3.10.1 Atividade da SOD .....   | 41 |
| 3.10.1.1 Atividade em PAGE .....  | 41 |
| 3.10.1.2 Determinação das isoformas da SOD .....  | 42 |
| 3.10.2 Atividade da CAT .....   | 42 |
| 3.10.2.1 Atividade em espectrofotômetro .....   | 43 |
| 3.10.3 Atividade da GR .....  | 43 |
| 3.10.3.1 Atividade em espectrofotômetro .....   | 43 |
| 3.10.4 Atividade da APX .....   | 43 |
| 3.10.4.1 Atividade em espectrofotômetro .....   | 44 |
| 3.10.5 Atividade da GPOX .....  | 44 |
| 3.10.5.1 Atividade em espectrofotômetro .....   | 44 |
| 3.11 Análise densitométrica dos géis de atividade enzimática .....                                      | 44 |
| 3.12 Análise das concentrações de Na e Cd em folhas, raiz e frutos .....                                | 45 |
| 3.13 Delineamento experimental .....  | 45 |
| 4 RESULTADOS .....  | 47 |
| 4.1 Análise de matéria seca e de clorofila por SPAD .....   | 47 |
| 4.2 Perfil protéico em SDS-PAGE .....   | 51 |
| 4.3 Quantificação de malondialdeído (MDA) em espectrofotômetro .....                                    | 56 |
| 4.4 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em espectrofotômetro ..... | 59 |
| 4.5 Análise das enzimas antioxidantes .....   | 61 |
| 4.5.1 Atividade da SOD em PAGE .....  | 61 |
| 4.5.2 Atividade da CAT em espectrofotômetro .....   | 67 |
| 4.5.3 Atividade da GR em espectrofotômetro .....  | 69 |
| 4.5.4 Atividade da APX em espectrofotômetro .....   | 71 |
| 4.5.5 Atividade da GPOX em espectrofotômetro .....  | 73 |
| 4.6 Análise das concentrações de Na e Cd em folhas, raiz e frutos .....                                 | 75 |
| 5 DISCUSSÃO .....   | 77 |
| 5.1 Salinidade .....  | 77 |
| 5.2 Cádmio .....  | 82 |
| 6 CONCLUSÕES .....  | 89 |
| REFERÊNCIAS .....   | 91 |

APÊNDICES .....113



## RESUMO

### **Análise bioquímica do mutante hormonal de tomateiro *Never ripe (Nr)* submetido aos estresses por cádmio e salinidade**

A exposição das plantas a estresses bióticos e abióticos pode levar ao aumento dos níveis de espécies ativas de oxigênio (EAOs) nas células, gerando estresse oxidativo. Dentre os causadores de estresses abióticos mais estudados, estão a salinidade e o cádmio (Cd). A salinidade pode causar um desequilíbrio de íons nas células, resultando estresse osmótico. Já o Cd gera distúrbios nutricionais, estruturais e bioquímicos, levando ao aumento de EAOs. Para combater este excesso, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa que inclui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de desintoxicação. Os hormônios vegetais, como o etileno, controlam importantes vias do metabolismo celular, fazendo com que as plantas respondam de diferentes maneiras às condições de estresse. Fatores de estresse distintos podem resultar em respostas diferenciadas por parte das células e dos diferentes tecidos das plantas. O presente trabalho utilizou o tomateiro cv. Micro-Tom e seu mutante hormonal para etileno *Never ripe (Nr)* cultivados em solução nutritiva e submetidos aos estresses por 100 mM de NaCl e 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> em coletas distintas (sete, 20 e 36 dias). Neste trabalho, as respostas das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPOX) foram analisadas. Além disso, outros parâmetros importantes como quantificação de Cd e Na, peroxidação lipídica, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), análise do perfil protéico por SDS-PAGE e teor de clorofila foram avaliados. De acordo com os resultados, o Cd acumulou-se mais nas raízes, e o Na foi absorvido pela plantas e transportado até as folhas e frutos. O estresse provocado pelo Cd foi mais prejudicial ao desenvolvimento do MT, aumentando os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA, assim como a atividade das enzimas antioxidantes. Alterações nos perfis protéicos dos tecidos submetidos aos tratamentos com Cd e Na também foram observadas. A absorção de Na pelos frutos foi elevada, alterando a atividade das enzimas antioxidantes. A enzima que mais apresentou aumento de atividade foi a GR, tanto em folhas quanto em raízes, nos três períodos analisados, sugerindo que essa enzima pode estar associada à síntese de fitoquelatinas (PCs) nos tecidos. Isso mostra que as enzimas antioxidantes agem de maneira particular, conforme o período de estresse ao qual as plantas estão submetidas, de maneira que a resposta antioxidante é dinâmica e particular a cada tecido da planta.

Palavras-chave: Tomate; Cádmio; Salinidade; Mutante hormonal; Enzimas antioxidantes



## ABSTRACT

### **Biochemistry analyses of hormonal mutant *Never ripe (Nr)* to cadmium and salt stresses**

Plant exposure to abiotic and biotic stresses can lead to enhanced production of Reactive Oxygen Species (ROS) in cells, causing oxidative stress. Cadmium (Cd) and salt (NaCl) are among the most studied abiotic stresses. Salinity can cause ion disturb in the cell, resulting in osmotic stress. In the case of Cd, it can induce nutritional, structural and biochemistry changes, leading to increased ROS levels. Plants have developed efficient antioxidant systems to act against ROS, including a series of enzymatic and non-enzymatic detoxification mechanisms. Plant hormones, such as ethylene, can control important pathways, which may result in different manners for the plant to respond to stressful conditions. Different stress factors can result in different responses depending of plant cells and tissues. This work used the miniature tomato Micro-Tom and its hormonal mutant to ethylene counterpart, *Never ripe (Nr)*, which were maintained in nutritional solution and submitted to 100 mM of Na Cl and 0.5 mM of CdCl<sub>2</sub> for 7, 20 and 36 days. Antioxidant enzymes responses mainly by changes in activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPOX) were analyzed. Moreover, others important evaluation parameters such as Cd and Na quantification, lipid peroxidation, level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SDS-PAGE and chlorophyll amount, were assessed. According to the results, Cd accumulated in roots while Na was uptaked and translocated to the leaves and fruits. The stress caused by Cd was the most damaging to MT plant development, increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid peroxidation, as well as antioxidant enzymes activities. Alterations in SDS-PAGE protein profiles were also observed. The uptake of Na in fruits was high, modifying antioxidant enzymes activities. GR was the enzyme that exhibited the highest increase in activity in leaves and roots during all periods analyzed, suggesting that this enzyme can be related to phytochelatin synthesis (PCs) in tissues and/or increased glutathione synthesis. The results confirmed that the enzymes may respond differently depending on the tissue, organ, time length of exposure and concentrations of the stressful agent.

**Keywords:** Tomato; Cadmium; Salinity; Hormonal mutant; Antioxidant anzymes



## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são expostas constantemente a estresses ambientais e dentre os estresses abióticos, a salinidade tem sido muito estudada, pois causa um desequilíbrio de íons nas células, o que resulta em toxicidade iônica e estresse osmótico. Outro estresse abiótico muito pesquisado é o causado pelos metais. O cádmio (Cd), advindo de indústrias de baterias e resíduos urbanos, gera distúrbios nas estruturas das células, provocando alterações nutricionais, estruturais, bioquímicas, entre outras. Esses estresses podem aumentar os níveis de espécies ativas de oxigênio (EAOs) nas células, gerando o chamado estresse oxidativo. Para combater essas espécies ativas de oxigênio que normalmente são produzidas no organismo, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa. Esse sistema de defesa inclui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de desintoxicação capazes de agir contra as EAOs, interrompendo as cascatas de oxidação descontrolada. Embora existam diversos sistemas antioxidantes, algumas enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GR), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPOX) foram centralizadas neste estudo.

Sistemas modelo são utilizados para entender os fenômenos biológicos, tornando possível que estas informações sejam estendidas a outros organismos. Geralmente, são de porte pequeno, de ciclo de desenvolvimento curto e necessitam de estrutura mínima para seu cultivo. Por este motivo, a cultivar miniatura do tomateiro Micro-Tom pode ser considerado um excelente material, que além de apresentar alta diversidade em metabólitos secundários, é considerado um modelo alternativo comparado a *Arabidopsis*, além de produzir frutos viáveis entre 70 e 100 dias. Além disso, vários mutantes hormonais já foram introduzidos no Micro-Tom, o que representa modelos de estudos complementares apresentando sensibilidade a hormônios. O fitormônio etileno é considerado o hormônio do estresse, respondendo a estresses bióticos e abióticos.

O presente trabalho vem analisando respostas desse mecanismo de defesa em tomateiros submetidos aos estresses por salinidade (NaCl) e por Cd, na cultivar Micro-Tom e no seu mutante hormonal para etileno *Never ripe (Nr)*. O objetivo do trabalho foi encontrar quais eram as respostas fisiológicas e bioquímicas que permitiriam diferenciar entre o *Nr* e MT. Em experimentos preliminares foi demonstrado que as doses de utilizadas de NaCl e de CdCl<sub>2</sub> ocasionavam estresse oxidativo em plantas de tomateiro. Assim, buscou-se compreender a resposta do sistema antioxidante em relação ao etileno do mutante *Nr* sob condições estresse.





## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O tomateiro como modelo de estudos biológicos**

O tomateiro tem sido classificado como um excelente modelo para estudar processos biológicos. A diversidade de metabólitos secundários e tecidos que facilitam análises bioquímicas, além do próprio padrão morfogenético diferente de *Arabidopsis*, coloca o tomateiro como um modelo adicional de dicotiledônea em estudos comparativos (PRATT et al., 1997). Como *Arabidopsis*, o tomateiro possui um genoma relativamente pequeno ( $7,1 \times 10^8$  pares de bases), e poucas seqüências repetitivas de DNA (LIMA et al., 2004), características que facilitam o conhecimento das estruturas genômicas. Além disso, é uma espécie muito cultivada e de grande importância econômica.

A cultivar miniatura de tomateiro, recentemente proposta por Meissner et al. (1997) como modelo genético, produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-100 mL de substrato, completando seu ciclo de vida entre 70 e 90 dias. Com essas características, a chamada cultivar Micro-Tom (MT) pode crescer em laboratório na mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis*. O ciclo de vida curto da cultivar MT possui a vantagem adicional de facilitar a obtenção de micro-plantas necessárias aos estudos fisiológicos. Portanto, esta cultivar pode crescer em laboratório com a mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis* (LIMA et al., 2004).

### **2.2 Mutantes hormonais em tomateiro**

Hormônios vegetais são de grande importância para o desenvolvimento das plantas. As auxinas, as citocininas e o etileno controlam diversas etapas do desenvolvimento: desde a divisão (ZHANG et al., 1996), a expansão (CLELAND, 1995) e a diferenciação celular até o amadurecimento de frutos e a senescência (BALBI; LOMAX, 2003).

O uso de mutantes para estudos de desenvolvimento tornou-se uma ferramenta muito importante, a qual tem sido amplamente utilizada nos últimos anos (GRAY, 2004). Entretanto, há poucos trabalhos relacionando as respostas aos variados estresses com os diferentes hormônios vegetais. Mutantes de tomateiro podem ser utilizados como uma eficiente ferramenta em estudos

genéticos para compreender os genes e suas funções. Poucas mutações foram bem caracterizadas a nível molecular nesta espécie, apesar de estas terem sido identificadas durante muitas décadas. Como exemplo disso, podemos citar as mutações espontâneas e induzidas (EMMANUEL; LEVY, 2002). Entre as várias mutações já descritas em tomateiro, contam-se as que apresentam alterações no metabolismo ou na sensibilidade a hormônios do tipo auxina (KELLY; BRADFORD, 1986), ácido abscísico (TAYLOR et al., 2000), giberelinas (KOORNNEEF et al., 1990), etileno (WILKINSON et al., 1995) e brassinoesteróides (KOKA et al., 2000).

### **2.2.1 O mutante hormonal de tomateiro *Never ripe (Nr)***

Muitas espécies de plantas são confrontadas com uma série de estresses, bióticos e abióticos, aos quais são capazes de integrar diferentes respostas. Muitos trabalhos relatam a existência de um complexo sistema de sinais reguladores que ocorrem em plantas durante os estresses abióticos (FRANCIA et al., 2007). Vários estudos mostram que as respostas celulares a estas mudanças ambientais podem explicar a razão pela qual as plantas resistentes a um determinado estresse são, algumas vezes, tolerantes a outros tipos de estresses (FRANCIA et al., 2007). Os fitormônios como a auxina e o etileno intermedeiam importantes papéis nas vias de transdução de sinais, permitindo que as plantas respondam ao estresse (TORRES; DANGL, 2005). Os sinais transduccionais induzidos pelo estresse não são bem conhecidos, mas a similaridade entre as respostas aos estresses abióticos pode indicar a relação das EAOs na resposta ao hormônio (GRATÃO et al., 2009). Assim, o uso de mutantes hormonais que estão disruptos nas suas respostas aos hormônios são frequentemente utilizados para demonstrar ou excluir interações entre vias de sinais de transdução (COENEN; LOMAX, 1998), porém pouco relacionados diretamente aos fatores de estresse.

No caso do mutante *Never ripe (Nr)*, o gene *NR* foi identificado através da homologia com o *ETR1* e isto mostrou que o tomate mutante para amadurecimento (*Nr*) (RICK; BUTLER, 1956), apresenta uma mutação no domínio de ligação ao etileno presente no receptor do NR (WILKINSON et al., 1995), o que impossibilita a ligação ao hormônio. A mutação natural semi-dominante *ET-insensível (Nr)*, parece ser de uma simples substituição de bases na região de codificação N-terminal do gene *LE-ETR3 (NR)*, homólogo do *ETR1* em *Arabidopsis* (WILKINSON et al., 1995). A expressão do *ETR1* em leveduras mostra que os primeiros 165

aminoácidos são necessários e suficientes para a ligação do etileno (SCHALLER; BLEECKER, 1995). A ligação do etileno com o receptor é mediado pelo cofator cobre. Mutantes que não se ligam ao cofator cobre são incapazes de se ligar ao etileno. O receptor também exibe forte afinidade com a prata, que é largamente utilizada como um inibidor na percepção do etileno e age no complexo receptor por deslocar o cobre no sítio ativo (RODRIGUEZ et al., 1999).

O efeito da mutação *Nr*, unido ao aumento da expressão do gene *NR*, observada no início do amadurecimento dos frutos do tipo selvagem, indica uma função específica desse receptor durante a etapa do amadurecimento. Sabe-se que este mutante apresenta um amadurecimento incompleto do fruto pela baixa sensibilidade ao etileno, de modo que o fruto pode apresentar pigmentação de amarela até o vermelho escuro, mas não ocorre degradação da parede celular, não há mudanças na maciez, nem aumento de síntese de açúcares, fatores estes que caracterizam o amadurecimento dos frutos (WILKINSON et al., 1995).

### **2.2.2 Biossíntese de etileno**

De maneira geral, os fitormônios são responsáveis pela integração de muitos aspectos relacionados com o crescimento e desenvolvimento das plantas (KLEE, 2004). O etileno é rapidamente difusível, tendo um importante papel na integração de eventos relacionados ao desenvolvimento vegetal, como germinação de sementes, amadurecimento de frutos, abscisão e senescência, e aos fatores externos como altas e baixas temperaturas, injúrias mecânicas, estresses por metais no solo, entre outros, que podem conduzir a maior síntese de etileno. Pode estar associado a outros fitormônios como auxina, citocinina, ácido abscísico (ABA), ácido salicílico e jasmonato, relacionados a sua via de sinalização aos estresses biótico e abiótico nas plantas (ETHERIDGE et al., 2006).

O aminoácido metionina é o precursor do etileno. A etapa limitante da rota é a conversão do S-Adenosilmetionina (AdoMet) em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). A reação é catalisada pelo ACC sintase (ACCS), sendo frequentemente considerada como uma etapa limitante na síntese de etileno (KENDE, 1993). O ACC é oxidado a etileno, gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e cianeto de hidrogênio (HCN) pela ACC oxidase (ACCO) (Figura 1). Estas duas enzimas são codificadas por uma família de genes (KENDE, 1993). A ação do etileno também pode ser regulada dependendo do nível de percepção da célula. Seis receptores de etileno em tomate

(*Solanum lycopersicum*), designados por LeETR1, LeETR2, LeETR3 (NR), LeETR4, LeETR5 e LeETR6 foram isolados e caracterizados (KLEE; TIEMAN, 2002; KLEE, 2004). O *LeETR1* é expresso constitutivamente em todos os tecidos, já o *LeETR2* é expresso em baixos níveis em todos os tecidos, com indução de sua expressão em sementes antes da germinação e suprimido na alongação de seedlings e na senescência dos pecíolos foliares. Os mRNAs de *LeETR3* (NR) são mais expressos nos ovários e no amadurecimento do fruto (WILKINSON et al., 1995; LASHBROOK et al., 1998). O *LeETR4* está presente em alto níveis em flores e frutos e baixos nos tecidos vegetativos. A expressão do *LeETR5* é similar ao do *LeETR4*, porém os níveis de mRNA absoluto são mais baixas. Os genes de *LeETR6* também são expressos em abundância em tecidos reprodutivos (flores e frutos) e menos nos tecidos vegetativos (TIEMAN; KLEE, 1999).

O etileno é um componente crítico de muitos processos como a germinação de sementes, o amadurecimento de frutos, a abscisão e a senescência. É também um hormônio ligado ao estresse, porque os estímulos adversos bióticos e abióticos conduzem à síntese de etileno (BARRY; GIOVANNONI, 2007). A manipulação da biossíntese de etileno ou a sua percepção permitem a modulação de processos e cria plantas com traços mais robustos e desejáveis, o que dá a idéia da importância do etileno na planta (ARORA, 2005).

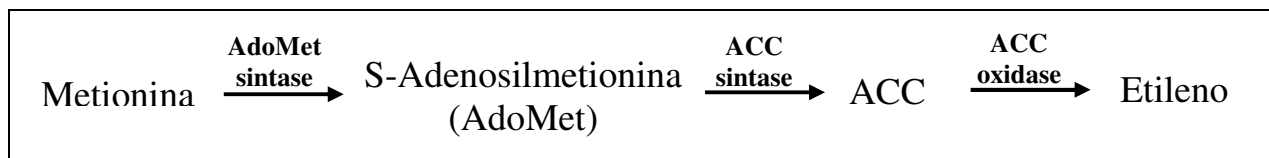


Figura 1 – Biossíntese de etileno simplificada

### 2.3 Estresse oxidativo em plantas

Uma das mais importantes funções das células das plantas é a sua habilidade em responder às modificações ambientais. Entender as conexões entre as respostas iniciais das plantas aos variados tipos de estresses que conferem a ela sucesso no ajuste às condições de crescimento alteradas é uma das grandes metas da biologia de plantas (GREENE, 2002; GRATÃO et al., 2008).

Os radicais livres e outras EAOs, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), são produzidos de forma contínua e em baixas concentrações em qualquer sistema vivo, como um dos produtos

do metabolismo aeróbio. Conseqüentemente, os organismos desenvolveram diversos sistemas antioxidantes de defesa, visando à proteção contra os possíveis danos causados pelas EAOs (GRATÃO et al., 2005; 2008). Entretanto, plantas expostas a estresses bióticos e abióticos podem gerar um aumento na produção das EAOs maior que sua capacidade antioxidante celular (PANDHAIR; SEKHON, 2006), caracterizando o processo de estresse oxidativo. Este estresse pode desencadear processos como a morte celular programada ou aumentar a resposta sistêmica de resistência a patógenos (MAHALINGAM; FEDOROFF, 2003). Por outro lado, as EAOs podem também agir como sinalizadoras em vários processos adaptativos e sinais regulatórios intrínsecos de crescimento e desenvolvimento (PITZSCHKE et al., 2006).

Vários mecanismos são utilizados pelas plantas para desintoxicar a célula das EAOs produzidas, interrompendo as cascatas de oxidação descontrolada (GRATÃO et al., 2005; PITZSCHKE et al., 2006). A identificação dos pontos de produção das EAOs, intensidade de sinal, estágio de desenvolvimento da planta e interações com outras moléculas sinalizadoras estão envolvidas com respostas biológicas específicas (GECHEV et al., 2006).

A resposta das plantas ao estresse oxidativo não é bem conhecida como é no caso das bactérias, leveduras e dos seres humanos (SOARES NETTO, 2001). O radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) é formado rapidamente na célula e pode causar danos às diversas classes de macromoléculas, especialmente aos ácidos nucléicos. A funcionalidade das proteínas pode também ser afetada pelas EAOs, tanto por oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos como por reações secundárias com produtos aldeídicos da peroxidação lipídica (REINHECKEL et al., 1998). É possível que as mudanças observadas em sistemas antioxidantes ocorram como um resultado de processos de degradação celular não específico. Existem poucos estudos enfocando a oxidação das proteínas, embora sejam biomoléculas essenciais às células pelas suas funções diversificadas e únicas.

Sabe-se, porém, que a peroxidação dos lipídios das biomembranas é um dos principais indicadores da ocorrência do processo de estresse oxidativo (SEO, 1998), gerando vários produtos que podem servir como indicativos da ocorrência dos danos oxidativos aos lipídios. Dentre estes produtos, o malondialdeído (MDA), é frequentemente utilizado como indicador do processo de peroxidação lipídica (DEWIR et al., 2006).

Os radicais peróxidos podem combinar-se entre si ou podem atacar proteínas da membrana plasmática e da célula em geral, sendo capazes também de abstrair  $\text{H}^+$  de outras

cadeias e de ácidos graxos, propagando a reação em cascata. A velocidade da propagação da reação é função de vários fatores, como a relação lipídio/proteína na membrana, a composição de ácidos graxos, a concentração de oxigênio e a presença de antioxidantes (HALLIWELL et al., 1993).

## 2.4 Salinidade em plantas

Durante séculos, a prática da agricultura em ambientes áridos e semi-áridos é realizada em solos com alta salinidade. A salinidade é um dos fatores abióticos mais importantes que causam estresses as plantas, limitando-as em crescimento e produtividade (FLOWERS, 2004). Quase 1000 milhões de hectares de solos cultivados são afetados pela alta salinidade (SZABOLCS, 1994). A salinidade do solo torna-se mais problemática devido ao aumento da irrigação nas terras aráveis no mundo. Os efeitos da salinidade afetam quase todos os aspectos fisiológicos e bioquímicos das plantas, causando uma redução significativa na produção. Altas concentrações de sais exógenos afetam a germinação de sementes, causam déficit hídrico, além de gerarem um desequilíbrio de íons nas células, pelo excesso de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , além da troca dos íons  $\text{Mg}_2^+$  por  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , o que resulta em toxicidade iônica e estresse osmótico (SAIRAM; TYAGI, 2004; MANDHANIA et al., 2006). Efeitos específicos de estresses salinos no metabolismo de plantas, especialmente o envelhecimento de folhas, foram relacionados às atividades dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em concentrações tóxicas, ou na ausência de  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  em quantidades suficientes (AL-KARAKI, 2000). Além disso, diversos danos oxidativos estão relacionados ao desequilíbrio iônico e ao estresse osmótico.

Estudos prévios informam efeitos do estresse salino no metabolismo de nitrogênio (CARILLO et al., 2005). O nitrato, carregado pelos transportadores específicos, é reduzido a amônio por uma reação seqüencial da nitrato redutase no citosol e da nitrito redutase em plastídios/cloroplastos. A assimilação do amônio em glutamina e glutamato são essenciais para o crescimento da planta, pois esses dois aminoácidos servem como precursores para a síntese de outros aminoácidos, bem como de outros componentes nitrogenados. O estresse salino inibe a assimilação de amônio (SAHU et al., 2001; KHADRI et al., 2001) e induz mudanças no pool de aminoácidos (ASHRAF; BASHIR, 2003). A redução do nitrato e a assimilação de amônio parecem implicar na regulação do crescimento de plantas em resposta ao estresse salino.

A fixação limitada de CO<sub>2</sub>, devido a condições de estresse, leva a uma diminuição na taxa de redução de carbono ocorrida no Ciclo de Calvin, além de uma redução na oxidação da NADP<sup>+</sup>, que é o receptor de um elétron durante a fotossíntese. Quando a ferredoxina é reduzida durante a transferência de elétrons na fotossíntese, estes podem ser transferidos para o oxigênio do PS-I para formar radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) pelo processo denominado Reação de Mehler, que tornam as EAOs mais reativas. Qualquer desequilíbrio no potencial redutor da célula pode ser chamado de estresse oxidativo e resulta na produção de EAOs. O estresse salino aumenta a taxa de produção de EAOs, como O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>OH, e oxigênio singlet. Sabe-se que essa citotoxicidade ativa as EAOs, que também são geradas durante os processos metabólicos nas mitocôndrias e nos peroxissomos, destruindo o metabolismo normal através da peroxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (GUETA-DAHAN et al., 1997; GRANT; LOAKE, 2000).

Estudos revelam que a tolerância de sal pode aumentar se os radicais livres formados durante os danos oxidativos forem desintoxicados através do sistema antioxidante (SHIGEOKA et al., 2002), pois há evidência de que a diminuição dos danos oxidativos e o aumento da resistência à salinidade e outros estresses ambientais estão provavelmente ligados à ação do sistema antioxidante celular (DEMIRAL; TURKAN, 2005). A capacidade de tolerância ao sal nas espécies tolerantes está intimamente ligada à manutenção de atividades específicas de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e as peroxidases. Nas folhas de quatro cultivares de arroz, por exemplo, as enzimas exibiram diferentes sensibilidades ao estresse provocado pelo excesso de NaCl (DEMIRAL; TURKAN, 2005). Assim, a intensidade dos danos provocados pelo excesso de salinidade depende do balanço entre o EAOs e sua remoção pelo sistema antioxidante (DEMIRAL; TURKAN, 2005).

## 2.5 Cádmio

Atualmente existe uma grande preocupação sobre os efeitos tóxicos que alguns poluentes ambientais possam exercer sobre a saúde pública e o meio ambiente. A contaminação do ambiente por metais pesados está afetando diferentes áreas do mundo como resultado das atividades agro-industriais, que indiscriminadamente são responsáveis pelo aumento da poluição (GRATÃO et al., 2005; 2008). O termo “metal pesado” é aplicado a um grupo heterogêneo de elementos, incluindo metais, semimetals e não metais (MELO et al., 1997), que possuem número



atômico maior que 20 ou peso específico maior que  $5 \text{ g.cm}^{-3}$ . Alguns deles são nutrientes essenciais aos vegetais, como o cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), molibdênio (Mo) e zinco (Zn), outros são benéficos ao crescimento das plantas, como o cobalto (Co), e outros não são essenciais ou não apresentam função, caso do alumínio (Al), cádmio (Cd), cromo (Cr), selênio (Se), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) (MELO et al., 1997).

Metais pesados liberados no ambiente terrestre tendem a se concentrar no solo e sedimentos, que são um grande reservatório disponível para as raízes das plantas, vulneráveis à variação de concentrações destes elementos. A presença de metais pesados na rizosfera pode causar decréscimo no crescimento (WÓJCIK et al., 2005) e distúrbios no metabolismo celular (GRATÃO et al., 2005). Os danos causados pelos metais pesados às plantas estão relacionados às suas concentrações disponíveis no meio e à variação genotípica das diferentes espécies vegetais. Estes danos vêm sendo extensivamente estudados sob os aspectos biológicos e ecológicos. Além disto, é de se esperar que as propriedades químicas de cada metal determinem mecanismos diferentes de estresse oxidativo e de resposta dos organismos à exposição ao mesmo, conforme demonstrado por Cuypers et al. (1999).

O cádmio (Cd) é o principal contaminante ambiental e um dos mais tóxicos entre os metais pesados (GRATÃO et al., 2005; 2008). Descoberto em 1817 por Stromeyer como uma impureza do carbonato de zinco, este elemento químico pertence ao grupo II-B da tabela periódica, juntamente com o Zn e o Hg, sendo relatado que a concentração de Cd na crosta terrestre varia entre 0,15 e 0,20 mg/kg (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994). O Cd tem sua concentração aumentada no ambiente devido às atividades humanas de mineração, adubação com lodo de esgoto e efluentes industriais contaminados, fabricação de baterias de automóveis, aplicações militares e aeroespaciais, estabilização de plástico e formulação de pigmentos, entre outros (PRASAD, 1995).

Na planta, o Cd pode provocar alterações nas funções dos estômatos, transporte de elétrons, Ciclo de Calvin-Benson, desordens na estrutura dos grana nos cloroplastos e na síntese de clorofila (VITÓRIA et al., 2006). Investigações ultra-estruturais revelaram que o Cd induz desorganização na estrutura das folhas, como espaços intercelulares reduzidos, severas alterações na estrutura dos cloroplastos e distúrbios na dilatação das membranas dos tilacóides (DJEBALI et al., 2005; GRATÃO et al., 2009), afetando ainda a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (KESSELER; BRAND, 1995). O Cd pode causar inibição da divisão celular e alterações nos

cromossomos (SOBKOWIAK; DECKERT, 2003), podendo ligar-se a grupos SH de enzimas, inibindo sua atividade (GUO et al., 2004).

O acúmulo de Cd em determinados tecidos da planta pode levar a uma rejeição comercial de certas cultivares (YANG et al., 2004), além de se tornar perigoso à saúde humana (WAGNER, 1993). Rauser (1995) relata que mais de 70% do Cd absorvido pelo homem tem origem na ingestão de vegetais. Desta forma, as plantas constituem-se no principal ponto de ligação entre metais pesados e o homem, via cadeia alimentar (GALLI et al., 1996), tornando-se necessário o estudo do efeito do Cd em plantas. Sabe-se que em animais a exposição prolongada ao Cd provoca distúrbios renais e enfisemas pulmonares, desmineralização óssea, destruição dos eritrócitos e câncer (GHOSHROY et al., 1998). Este metal pode se acumular no corpo humano por um período superior a 10 anos (SALT et al., 1995).

Ainda nas plantas, o Cd pode provocar danos à transpiração, translocação através do floema, respiração, relações hídricas, reprodução, mudanças em certas organelas, rompimento estrutural e funcional das membranas celulares (PRASAD, 1995) e danos às raízes. Também, o aparecimento de uma coloração marrom avermelhada nas margens das folhas e nervuras (SCHICKLER; CASPI, 1999) e clorose das folhas, têm sido apontados como um dos sintomas mais característicos em plantas intoxicadas por este metal (DAS et al., 1997), devido ao fato de que o Cd facilmente interage e compete com o Fe (SALT et al., 1995), Ni (BACCOUCH et al., 1998) e Cu (MOCQUOT et al., 1996) por sítios de absorção na membrana plasmática (NASCIMENTO; PEREIRA, 1997), suprimindo a absorção desses elementos e induzindo deficiência desses elementos neste órgão.

## **2.6 Mecanismos de defesa em resposta ao estresse oxidativo em plantas**

Plantas expostas ao estresses bióticos e abióticos podem gerar mais EAOs do que sua capacidade de limpá-los (PANDHAIR; SEKHON, 2006), ativando a morte celular programada ou aumentando a resposta sistêmica de resistência à patógenos (MAHALINGAM; FEDOROFF, 2003). Entretanto, as EAOs podem agir como sinalizadoras em vários processos adaptativos (APEL; HIRT, 2004; PITZSCHKE et al., 2006), dentro de respostas celulares apropriadas (BHATTACHARJEE, 2005). Vários mecanismos são utilizados pelas plantas para desintoxicar as EAOs produzidas sob condições normais do metabolismo ou quando situações de estresse

oxidativo são estabelecidas (GRATÃO et al., 2005; POMPEU et al., 2008). Recentemente, as informações sobre o papel das EAOs têm sugerido que elas são consideradas não apenas moléculas sinalizadoras de estresse, mas também sinais regulatórios intrínsecos de crescimento e desenvolvimento (VRANOVÁ et al., 2002). A identificação dos pontos de produção das EAOs, intensidade de sinal, estágio de desenvolvimento da planta e interações com outras moléculas sinalizadoras estão envolvidas com respostas biológicas específicas (GECHEV et al., 2006).

A toxicidade das EAOs pode explicar a evolução de arranjos complexos de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de desintoxicação capazes de agir contra as EAOs, interrompendo as cascatas de oxidação descontrolada (PITZSCHKE et al., 2006). Estes mecanismos de defesa em plantas incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), que dismuta  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ . Subsequentemente,  $H_2O_2$  é desintoxicado a  $H_2O$  pela ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), catalase (CAT, 1.11.1.6,) e glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) (GRATÃO et al., 2005). Além disso, para a desintoxicação de  $H_2O_2$ , fitofenólicos podem agir como antioxidantes pela doação de elétrons para as peroxidases dependentes de guaiacol (GPOX, EC 1.11.1.7) (SAKIHAMA et al., 2002). O ciclo da GPX gera glutathione reduzida (GSH) a partir da glutathione oxidada (GSSG) através da ação da glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) usando NAD(P)H como agente redutor (APEL; HIRT, 2004). Todos estes compostos antioxidantes interagem, formando um sistema de resposta antioxidativa dinâmico, que pode minimizar as consequências do estresse e manter o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante (EMBERSON, 2003). Quantificar a atividade ou concentração dos antioxidantes é uma forma de avaliar o estado da planta e sua capacidade de tolerância aos poluentes ambientais (LONG; NAIDU, 2003). Assim, o estudo da atividade enzimática e de compostos produzidos por estresse serve como um critério de avaliação da fitotoxicidade da salinidade e de metais em plantas. Uma vez sabendo-se a via preferencial de desintoxicação destes agentes estressantes em diferentes espécies de plantas, pode-se traçar estratégias de estudo e melhoramento genético, como por exemplo, a manipulação de enzimas que possam condicionar tanto sensibilidade como tolerância a estes agentes estressores em diferentes cultivares, ou servir como bioindicadores ou marcadores da toxicidade por determinados efeitos estressores em ambientes particulares. Em todos esses casos, o parâmetro bioquímico a ser analisado poderia ser relativo aos níveis de atividade de enzimas antioxidantes.

### 2.6.1 Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EAOs nas células largamente distribuídas entre organismos que consomem oxigênio ( $O_2$ ) (ALSCHER et al., 1997; OLMOS et al., 2003). A SOD é responsável pela dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , influenciando as suas concentrações (Figura 2). As fontes geradoras de  $O_2^{\bullet-}$  podem ser naturais, pelos produtos de atividades metabólicas, incluindo cadeia transportadora de elétrons ou induzida por agentes externos (SEN RAYCHAUDHURI; DENG, 2000). As isoformas de SOD são codificadas no núcleo e quando necessárias, são transportadas até suas organelas por sequências  $NH_2$ -terminal sinalizadoras (BOWLER et al., 1994) e então compartimentalizadas. Em plantas superiores, diferentes isoformas têm sido detectadas em plantas e classificadas de acordo com o cofator metálico, Mn, Fe e Cu/Zn (ALSCHER et al., 2002). Mn-SODs estão localizadas em mitocôndrias e peroxissomos e têm sido reportadas em uma série de espécies (DEL RIO et al., 2003). A Fe-SOD está associada com cloroplastos (ALSCHER et al., 2002), enquanto que a Cu/Zn-SODs são encontradas no citosol, cloroplastos e peroxissomos (DEL RIO et al., 2002). Recentemente, uma classe distinta de SOD que contém Ni (Ni-SOD) foi descoberta em cianobactérias e *Streptomyces* (BARONDEAU et al., 2004).

A Fe-SOD é uma enzima dimérica formada por duas subunidades idênticas e está localizada no cloroplasto. A Mn-SOD é uma enzima que possui estrutura similar à Fe-SOD, sendo observada na matriz mitocondrial (BOWLER et al., 1994). Ambas são encontradas em procariontes e eucariontes. Entretanto, a Cu/Zn-SOD está presente geralmente no citoplasma de células eucarióticas e no cloroplasto. A Fe-SOD e a Mn-SOD parecem ser muito similares na estrutura primária e tridimensional e em outras propriedades físico-químicas. A Cu/Zn-SOD não apresenta tal similaridade. Assim, presume-se que tanto a Fe-SOD como a Mn-SOD podem ter um ancestral comum, sendo que a Cu/Zn-SOD possivelmente evoluiu independentemente (CHEN; LIU, 1996). Bowler et al. (1992) relataram em seus estudos de filogenia da SOD que a Mn-SOD e a Fe-SOD são as mais antigas, indicando que provavelmente evoluíram antes da divergência entre procariontes e eucariontes, enquanto que a Cu/Zn-SOD, mais recente, evoluiu independentemente em algum ponto no início da linhagem eucariótica, indicando uma dupla evolução desta enzima. De maneira geral, as Cu/Zn-SODs são encontradas no citosol e no estroma dos cloroplastos (HAYAKAWA et al., 1984) e são sensíveis ao radical cianeto ( $CN^{\bullet-}$ )

(MALLICK; MOHN, 2000). As Mn-SODs e Fe-SODs não são sensíveis ao CN<sup>-</sup> e têm sido encontradas geralmente na matriz mitocondrial de células eucarióticas e em células procarióticas. Segundo Van Camp et al. (1996), as isoformas de SOD apresentam grande semelhança entre as diferentes espécies de plantas. Contudo, o número e tipo destas isoformas variam de planta para planta (SCANDALIOS, 1993). A Cu/Zn-SOD foi encontrada no citosol de arroz (PAN; YAU, 1991), nas mitocôndrias de girassol (CORPAS et al., 1991) e no cloroplasto de *Arabidopsis* (KLIEBENSTEIN et al., 1998). A Mn-SOD foi encontrada em mitocôndria de aveia (SEHMER; DIZENGREMEL, 1998) e em feijão (CORPAS et al., 1991). A Fe-SOD foi encontrada em plantas como *Arabidopsis* (KLIEBENSTEIN et al., 1998), com a função de catalisar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado durante a β-oxidação de ácidos graxos e em peroxissomos de folhas verdes durante a fotorrespiração pela transformação do glicolato em glioxilato (HAVIR; McHALE, 1989).

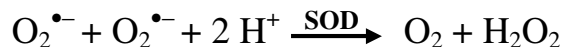


Figura 2 – Modo de ação da enzima superóxido dismutase para metabolizar o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>

### 2.6.2 Catalase (CAT)

A catalase metaboliza o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado nos peroxissomos em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (IGAMBERDIEV, LEA, 2002) (Figura 3). A CAT e várias aminotransferases do ciclo fotorespiratório estão localizados nos peroxissomos, com a CAT representando a maior constituinte da matriz peroxissomal em tecidos fotossintéticos (REUMANN; WEBER, 2006). A CAT pode também usar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar toxinas, incluindo fenóis, ácido fórmico e formaldeído. As isoenzimas de CAT são reguladas temporalmente e espacialmente, podendo responder diferentemente à luz (SKADSEN et al., 1995) e CO<sub>2</sub> (AZEVEDO et al., 1998). As isoenzimas de CAT têm sido estudadas extensivamente em plantas superiores (SKADSEN et al., 1995; SCANDALIOS et al., 2000; MICHAEL; MCCLUNG, 2002; BAGNOLI et al., 2004).

Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi proposto por vários pesquisadores que a CAT desempenha um papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbicos (MALLICK; MOHN, 2000). A

CAT é a única entre as enzimas degradantes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado nas células sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000). As evidências sugerem que a CAT utiliza mecanismos de dois estágios, tanto nas reações peroxidativas como nas catalíticas. No primeiro estágio, o ferro do grupo heme da CAT interage com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar um peróxido de ferro rico em  $\text{O}_2$ . Este composto intermediário é denominado de componente I. Em baixas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $<10^{-6}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ), o componente I pode ser reduzido por uma variedade de doadores de hidrogênio (por exemplo, etanol e ácido ascórbico). As elevadas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o componente I reage com uma segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para produzir água e uma molécula de  $\text{O}_2$  (SCANDALIOS, 1994).

Existem três tipos distintos de isoenzimas de CAT identificadas (CAT1, CAT2, CAT3) (SCANDALIOS, 1993). Em plantas a CAT1 é responsável por 80% da atividade total desta enzima e está localizada no interior dos peroxissomos, sendo 15 responsáveis pela transformação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido na fotorrespiração em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (WILLEKENS et al., 1997). A CAT2 é encontrada nos tecidos vasculares. A CAT3 está localizada no mesófilo das folhas (SCANDALIOS, 1990). Em plantas, as CATs concentram-se no citoplasma, principalmente nos peroxissomos de folhas e glioxissomos de tecidos que armazenam lipídeos, com exceção da CAT3 de milho e da CAT de algumas algas verdes que são mitocondriais, embora esta última ainda não tenha papel fisiológico totalmente compreendido (SKADSEN et al., 1995; FRUGOLI et al., 1996; IWAMOTO et al., 1998).

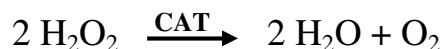


Figura 3 – Modo de ação da enzima catalase para metabolizar o  $\text{H}_2\text{O}_2$

### 2.6.3 Glutationa redutase (GR)

A glutaciona reduzida (GSH) é um importante metabólito no combate às EAOs (especificamente  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) via o Ciclo Halliwell-Asada. Para a regeneração de GSH, a partir da sua forma oxidada (GSSG), a enzima chave é a glutaciona redutase (GR) (LEE et al., 1998) (Figura 4). A enzima GR é de ocorrência quase universal, sendo amplamente distribuída entre

procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (CREISSEN et al., 1994). Em folhas de ervilha, a GR encontra-se presente no cloroplasto, mitocôndrias e compartimentos celulares (EDWARDS et al., 1990). A GR contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da GSSG para GSH (CREISSEN et al., 1994; VOET; VOET, 1995).

Foram realizados trabalhos estudando a GR em microrganismos, sendo relatado um aumento na atividade desta enzima sob elevada irradiação de UV (LESSER; STOCHAJ, 1990), deficiência de água (SMIRNOFF, 1993) e estresses promovidos por extremos de temperatura (RADY et al., 1994). Em *Anabaena doliolum*, entretanto, a exposição ao Cu promoveu um efeito negativo na atividade da GR (MALLICK; RAI, 1999). A glutathiona (GSH) é o componente tiol mais abundante em plantas, sendo considerado essencial para células de plantas e animais contra uma variedade de estresses oxidativos, incluindo poluição do ar, calor, frio e seca. Fadzillah et al. (1996) verificaram que em plantas de arroz submetidas ao frio ocorreu um aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e mudanças na razão de GSH para GSSG nos tecidos desta espécie.

A GSH tem papel importante como antioxidante e na síntese de fitoquelatinas (PCs). O papel da GSH na tolerância a metais pesados foi pesquisado por Gallego et al. (1996), que ao tratarem plantas de girassol com Cd observaram a diminuição do nível de GSH e a indução de PCs três dias após o início do tratamentos. De acordo com Creissen et al. (1994), para realização destas funções, a GSH deve estar na sua forma reduzida, reação esta causada pela GR. Desta forma, a GR tem importante papel na proteção do cloroplasto contra danos oxidativos mantendo a razão entre os níveis de GSH e GSSG (GALLEGO et al., 1996). Os genes de GR de ervilha e tabaco foram clonados e seqüenciados (CREISSEN; MULLINEAUX, 1995; STEVENS et al., 1997) e mais recentemente clones de cDNA têm sido obtidos a partir de enzimas humanas, o que confirmou a homologia na seqüência de aminoácidos de seres humanos e plantas (TUTIC et al., 1990). Porém, dificuldades na purificação e sequenciamento em plantas superiores têm, até recentemente, impedido algumas comparações diretas entre a seqüência de aminoácido de uma GR de planta e de outros organismos (CREISSEN et al., 1994). Schickler e Caspi (1999) mostraram que em plantas do gênero *Alyssum*, altas concentrações de metal diminuiram a atividade da GR. Em trigo, foi verificado o aumento da atividade da GR na presença do Ni (PANDOLFIN et al., 1996).

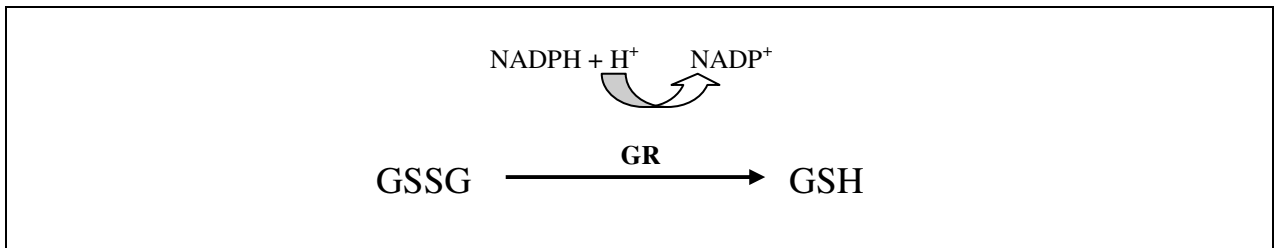


Figura 4 – Modo de ação da enzima glutaciona redutase para converter GSSG em GSH

#### 2.6.4 Ascorbato peroxidase (APX)

Em células vegetais, o substrato redutor mais importante para a destoxificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é o ascorbato (MEHLHORN et al., 1996; NOCTOR; FOYER, 1998). A ascorbato peroxidase (APX) catalisa a reação em que duas moléculas de ascorbato são oxidadas para reduzir uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a água. A regeneração de ascorbato envolve a oxidação de glutaciona reduzida, o que por sua vez é regenerado por ação da GR (FOYER; HALLIWELL, 1976), constituindo o Ciclo de Ascorbato-Glutaciona (FOYER; HALLIWELL, 1976) (Figura 5).

As isoenzimas de APX estão distribuídas em pelo menos quatro compartimentos celulares distintos: o estroma e membrana do tilacóide, nos cloroplastos, e microcorpos e citosol (ASADA, 1992; MIYAKE; ISHIKAWA et al., 1995). Os cDNAs que codificam as isoenzimas de APX foram isoladas de várias espécies vegetais e já foram bem caracterizados por vários grupos de pesquisa (MITTLER; ZILINSKAS, 1994), sendo que uma segunda família de cAPX também já foi relatada em várias espécies tais como espinafre, *Arabidopsis*, soja e arroz (ISHIKAWA et al., 1995; SANTOS et al., 1996; JESPERSEN et al., 1997).

Diversos trabalhos relatam as alterações na atividade e no nível de expressão de APX sob condições de estresse ambiental, tais como ozônio, radiação ultravioleta, baixa temperatura associada a alta luminosidade, estresse hídrico e infecção por patógenos (SCHÖNER; KRAUSE, 1990; MITTLER; ZILINSKAS, 1994; MITTLER et al., 1998), além de estresse gerado por metais pesados, principalmente Cd e Cu.



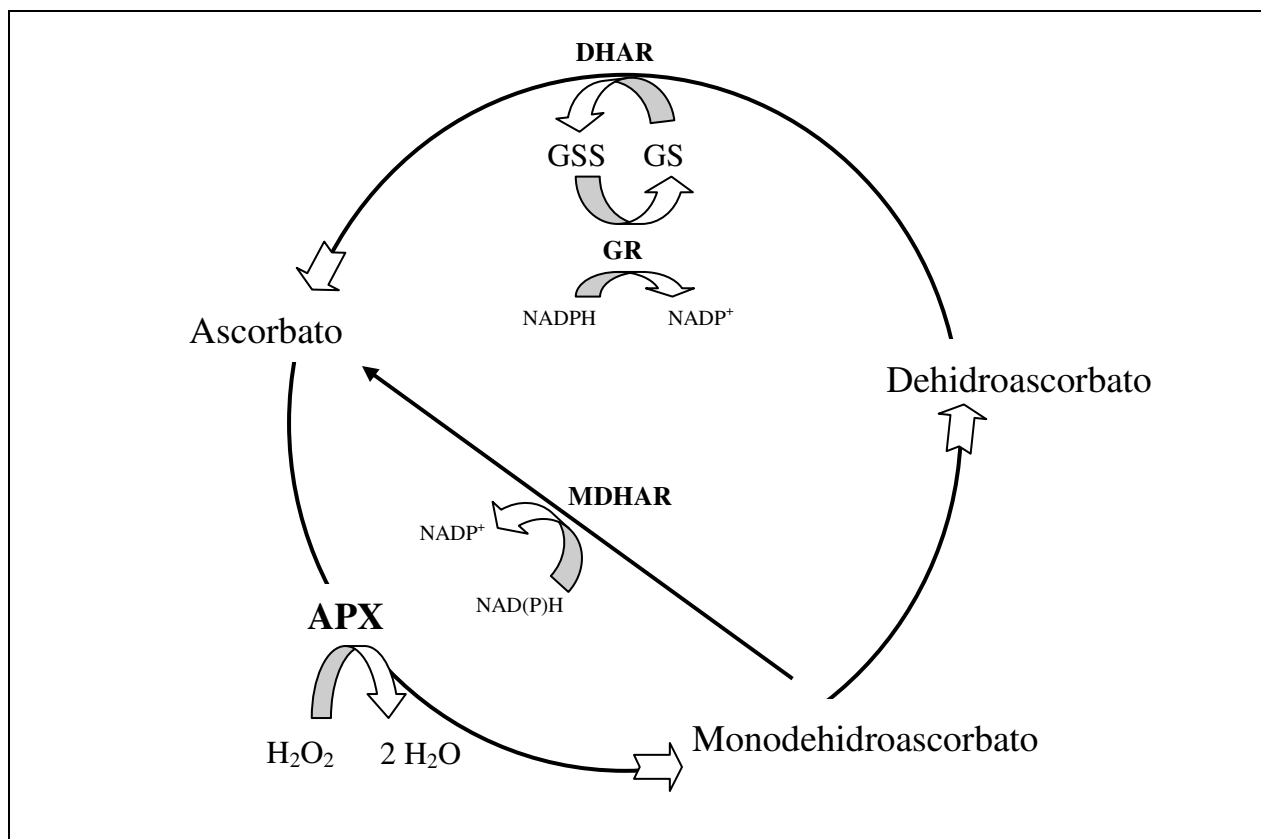


Figura 5 – Modo de ação da enzima ascorbato peroxidase para converter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O

### 2.6.5 Guaiacol peroxidase (GPOX)

As peroxidases são hemoproteínas que catalizam a oxidação do substrato concomitantemente à redução do peróxido de hidrogênio. O mecanismo de ação da guaiacol peroxidase (GPOX) é o mesmo da APX, embora a GPOX utilize doadores de elétrons aromáticos como guaiacol e pirogalol (ASADA, 1999). Entretanto, uma peroxidase que oxida ascorbato com um aminoácido similar a GPOX foi encontrada em *Camellia sinensis* (KVARATSKHELIA et al., 1997). A GPOX tem quatro pontes dissulfeto ligadas a oito resíduos conservados de cisteína para a ligação de carboidratos e Ca<sup>2+</sup>. A APX não contém carboidrato e não apresenta sequências correspondentes para glicosilação e ligação ao Ca<sup>2+</sup> (ASADA, 1999). As peroxidases participam de vários processos metabólicos essenciais incluindo regulação do crescimento celular, lignificação, oxidação fenólica, defesa contra patógenos e proteção contra estresses. (GOLDBERG et al., 1986). Nas espécies vegetais e em particular no linho (*Linum usitatissimum*), a GPOX apresenta isoformas ácidas e básicas. A isoforma ácida está envolvida

numa variedade de processos relacionada com a biossíntese da parede celular, incluindo a formação de lignina. A isoforma básica participa da regulação da degradação do ácido indolacético (AIA) e da síntese de etileno (FIELDES; GERHARDT, 1998).

Em experimentos *in vitro*, a GPOX catalisa a oxidação dos doadores de hidrogênio devido à ausência de substrato específico. No entanto, *in vivo* a GPOX pode utilizar o ascorbato como substrato para suas reações. Neste caso, a destoxificação pode se tornar a função principal de algumas isoformas (FIELDES; GERHARDT, 1998). Como exemplos, podemos citar em plantas o aumento na atividade da GPOX na presença da radiação UV-B, constatado em *Hibiscus rosa-sinensis* e *Beta vulgaris* (PANAGOPOULOS et al., 1990). Supõe-se que o estudo das alterações provocadas pela indução de estresses fisiológicos poderia contribuir para a melhor compreensão da ação específica das isoformas da GPOX (CAMPA, 1991).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética e no Laboratório do Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP).

#### 3.1 Materiais biológicos

Para o presente trabalho, foi utilizado o mutante hormonal *Never ripe* (Tabela 1) já obtido em plantas de tomateiro de porte pequeno, bem como o parental Micro-Tom. Esse mutante foi selecionado em função do etileno estar relacionado a uma variedade de trabalhos envolvendo estresse oxidativo. O etileno está principalmente envolvido no início da resposta ao estresse, como abscisão foliar, senescência, regeneração de lesões e aumento na resistência a moléstias.

Tabela 1 - Características morfológicas e funções dos genes do *Never ripe*

| Mutante                | Classe hormonal | Características morfológicas e funções dos genes correspondentes   | Ref.                    |
|------------------------|-----------------|--|-------------------------|
| <i>Never ripe</i> (Nr) | Etileno         | <ul style="list-style-type: none"> <li>– Plântulas não apresentam tríplice resposta ao serem tratadas com etileno;</li> <li>– Frutos não amadurecem totalmente;</li> <li>– Defectivo para gene receptor de etileno.</li> </ul> | Wilkinson et al. (1995) |

#### 3.2 Experimento básico

O mutante *Never ripe* e o parental Micro-Tom foram semeados em substrato orgânico inerte (Plantmax HT Eucatex, Brasil) com vermiculita, na proporção 1:1, adubado com 1 g de NPK (10-10-10), com 4 g de calcário dolomítico (Ca + Mg) por litro de substrato (homogeneizado). Após duas semanas da semeadura, foi realizado o transplântio das mudas para vasos Leonard com areia de rio autoclavada de textura média com flocos de isopor, na proporção de 1:1 (Figura 6). O isopor foi utilizado para promover aeração no substrato. Posterior ao transplântio, solução nutritiva padrão de Hoagland e Arnon (1950) a 25% foi utilizada nos dois primeiros dias, sendo substituída por solução 100% após esse período de aclimação, trocada

constantemente a cada sete dias. No início da floração, as concentrações do metal e do sal foram colocadas na solução nutritiva. Os materiais (folha, raiz e fruto) foram coletados nos seguintes períodos:

- TO: plantas sem contaminação, coletadas no dia da aplicação dos tratamentos;
- 1ª coleta: sete dias após a aplicação dos tratamentos;
- 2ª coleta: 20 dias após a aplicação dos tratamentos;
- 3ª coleta: 36 dias após a aplicação dos tratamentos.

A coleta aos sete dias foi realizada para observar uma provável resposta rápida dos genótipos aos estresses e, as posteriores coletas, para acompanhar as respostas do sistema antioxidante frente aos estresses ao longo do desenvolvimento dos genótipos.



Figura 6 – Plântulas de tomateiro e vasos Leonard utiliza. A. Tamanho das plântulas transplantadas; B. Vaso Leonard com areia e isopor na proporção 1:1

### **3.2.1 Vasos Leonard**

Os vasos foram montados a partir de garrafas de plástico de um litro cortadas ao meio e uma das metades (a do bico) virada para baixo, de modo a encaixar na outra parte, e perfuradas para colocação de fios de náilon que serviriam de capilares. Esses vasos foram então pintados com tinta spray prata para não ocorrer absorção da radiação solar durante o dia na casa de vegetação, assim como para impedir a proliferação de algas no recipiente. A solução nutritiva com os tratamentos era passada semanalmente pela areia, deixada escorrer em recipientes próprios e no recipiente suporte era colocada água destilada para manter o substrato úmido.

### **3.3 Matéria seca**

Os materiais vegetais foram coletados nos períodos determinados e colocados em sacos de papel pardo para serem secos em estufa a 55°C durante cinco dias. Após a secagem, foi medida a massa seca da folha e da raiz aos sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos e massa seca dos frutos aos 36 dias de exposição aos tratamentos. Os dados estão expressos em gramas.

### **3.4 Determinação de clorofila por SPAD**

O medidor de clorofila (ou medidor SPAD) é uma ferramenta simples, portátil que mede a perda da cor verde ou a concentração relativa de clorofila em folha (KARIYA et al., 1982). A medição fornece leituras instantâneas e não destrutivas em plantas baseadas na quantificação da intensidade de luz absorvida da amostra de folha. Desenvolvido pela Companhia Minolta no Japão, o aparelho Chlorophyll Meter SPAD-502 (Soil and Plant Analysis Development) permite a avaliação indireta do teor de clorofila nas plantas. Esse aparelho recebeu no Brasil o nome de clorofilômetro e expressa os resultados em valor de unidades SPAD. Por ser portátil e de fácil manuseio, esse aparelho é usado diretamente no campo e fornece resultados imediatos de estimativa do teor de clorofila através de leituras realizadas no limbo foliar (KONICA MINOLTA SENSING, 2003). Um dos métodos utilizados em laboratório para a determinação de clorofila é descrito por Arnon (1949). Porém esse método, ainda que fácil, apresenta desvantagens como coleta destrutiva do material vegetal e extração via maceração com acetona.

Com o advento de medidores portáteis a estimativa do teor de clorofila tornou-se fácil e rápida, sendo realizada diretamente no campo (YADAVA, 1986).

O aparelho foi utilizado semanalmente fornecendo leituras correspondentes ao teor do pigmento presente na folha. Os valores foram calculados pelo equipamento com base na quantidade de luz transmitida pela folha em duas regiões de comprimento de onda (400-500 nm e 600-700 nm) nas quais a absorção de clorofila é diferente. O instrumento foi utilizado para estimar a concentração de nitrogênio da folha, visto que o teor de clorofila se relaciona positivamente com a concentração desse nutriente (MALAVOLTA et al., 1997).

### **3.5 Extração de proteínas**

Os materiais vegetais coletados (raiz, folha e fruto) foram coletados nos determinados períodos na casa de vegetação e colocados em nitrogênio líquido, sendo conservados em freezer -80° até o momento da extração. Posteriormente, foram colocadas em um mortar no qual foi adicionado N<sub>2</sub> líquido e feita a maceração até ficar com o aspecto de farinha. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo 1 mM EDTA (ácido etileno diamino tetracético), 3 mM DTT (ditiotretol) e 4% (p/v) PVPP (polivinilpolipirrolidona) de acordo com Gomes-Junior et al. (2007). O homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm por 30 minuto à 4°C, utilizando uma centrífuga Beckman modelo J2-MC. O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

### **3.6 Determinação de proteína**

A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão. Foi utilizado o espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40. O resultado da quantificação está apresentado em mg/mL.

### 3.7 SDS-PAGE

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante para desnaturá-las em subunidades. O agente dissociante comumente utilizado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína é desnaturada pelo aquecimento, na presença do SDS e mercaptoetanol, cuja função é quebrar as ligações dissulfeto (LAEMMLI, 1970).

As proteínas das amostras foram separadas utilizando o sistema Mini Protean II da Bio-Rad. A concentração do gel foi de 10% de poliacrilamida. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 2,5 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9 e 5 mL de água e 100 µL de SDS 10%. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio (1%). Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7 e 2,75 mL de água e 50 µL de SDS 10%. Para a polimerização foram utilizados 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio (1%).

Para cada gel foram aplicados 4 µL de padrão BenchMark - Protein Ladder – Invitrogen e 8 µg de proteína por canaleta . A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de corrida (5X concentrado) contém 25 mM TRIS, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina e 1% de SDS 10%. O tampão de amostra contém 3 mL de água destilada, 1 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de SDS (10%), 400 µL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 400 µL de mercaptoetanol.

Após a corrida, o gel foi colocado em solução fixadora overnight contendo 40% de etanol e 10% de ácido acético glacial, completando o volume para 50 mL com água destilada. Posteriormente, o gel foi colocado em solução incubadora por 15 minutos, contendo 3,4 g de acetato de sódio trihidratado, 15 mL de etanol, 0,2 g de tiosulfato de sódio e 260 µL de glutaraldeído 25%, completando o volume para 50 mL. Lava-se o gel por 45 minutos (3 x 15 minutos) com água destilada e incubação do mesmo em solução de prata por 15 minutos, contendo 0,05 g de nitrato de prata e 10 µL de formaldeído, completando o volume para 50 mL com água destilada. O gel é colocado em solução reveladora (contendo 1,25 g de carbonato de sódio e 5 µL de formaldeído, completando o volume para 50 mL de água destilada) até



aparecerem as bandas e posteriormente repassados em solução stop (0,73 g de EDTA em 50 mL de água destilada) para parar a reação. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

### **3.8 Peroxidação de lipídeos**

A peroxidação de lipídeos foi determinada através da produção de metabólitos reativos a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA), segundo Heath e Packer (1968). As amostras frescas foram maceradas com 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) (0,1%) juntamente com 20% de PVPP. Após a perfeita homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 10.000 rpm por cinco minutos. Do sobrenadante, foi retirado 250 µL ao qual foi adicionado 1 mL de TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho seco por 30 minutos, a 95°C e resfriada em gelo, na sequência. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40 a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA é expressa em nmol/g de matéria fresca.

### **3.9 Conteúdo de peróxido de hidrogênio**

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi determinado através da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al.(2001). As amostras frescas foram maceradas com 1 mL de TCA 0,1%. Após a perfeita homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Do sobrenadante, foi retirado 200 µL ao qual foi adicionado 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de KI (a solução deve ser preparada com água ultrapura). O branco consiste na mesma mistura descrita acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, coloca-se 200 µL de TCA 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40 a 390 nm. A quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é expressa em µmol/g de matéria fresca.

### **3.10 Atividade das enzimas antioxidantes**

Para os ensaios enzimáticos foram utilizados extratos protéicos provenientes das amostras vegetais estocadas em freezer -80° C. Foram realizados ensaios de atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) em géis não desnaturantes (PAGE), Catalase (CAT), Glutathione Redutase (GR), Ascorbato Peroxidase (APX), Guaiacol Peroxidase (GPOX) em espectrofotômetro.

#### **3.10.1 Atividade da SOD**

A atividade da SOD foi determinada unicamente em gel não desnaturante (PAGE).

##### **3.10.1.1 Atividade em PAGE**

A atividade da superóxido dismutase em PAGE foi determinada através dos extratos vegetais, cujas proteínas foram separadas por eletroforese em gel 12%. Foi utilizado o sistema Mini Protean II da Bio-Rad. O gel possui espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 3,0 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 3 M (hidroximetil)-aminometano (pH 8,9) e 4,5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio (1%).

Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7 e 2,75 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio (1%).

A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo foi TRIS 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina - 5X concentrado, sendo diluído para 1X e reutilizado até 3 vezes. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de SOD de fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 40 µg de proteína dos extratos protéicos. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada de acordo com Gomes-Junior et al. (2006).

Os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro a temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o desenvolvimento de bandas brancas sob fundo roxo. Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel, propiciando a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes à atividade de SOD permanecem sem se fotooxidar, promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

### **3.10.1.2 Determinação das isoformas da SOD**

Para a determinação das isoformas da SOD foi realizada uma eletroforese com 200 µg de extrato protéico de folha, raiz e fruto, nas mesmas condições descritas anteriormente para SOD (item 3.9.5.1). Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes. A primeira parte foi mantida a 4°C em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda foi imersa em 100 mL do mesmo tampão contendo 2 mM de KCN e 0,0292 g de EDTA. A terceira, imersa em 100 mL do referido tampão contendo 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,0292 g de EDTA. Todos os passos descritos foram realizados no escuro.

Após 20 minutos nestas soluções, os géis foram submetidos a revelação com NBT e riboflavina, como citado anteriormente no item item 3.9.5.1. Ao final da revelação, foi analisada a presença ou ausência de bandas no controle, e nos tratamentos com KCN e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As isoformas foram então classificadas como Mn-SOD, Fe-SOD ou Cu/Zn-SOD. Mn-SOD é resistente a ambos inibidores (KCN e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Fe-SOD é resistente ao KCN e inibida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Cu/Zn-SOD é inibida por ambas as substâncias (AZEVEDO et al., 1998).

### **3.10.2 Atividade da CAT**

A atividade da CAT foi determinada por espectrofotometria.

### **3.10.2.1 Atividade em espectrofotômetro**

A atividade da CAT foi determinada como descrito por Kraus et al. (1995) com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998).

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a catalase foi determinada a 25°C em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (solução de 0,25%) preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de extrato protéico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 1 minuto, através das alterações na absorbância a 240 nm em cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

### **3.10.3 Atividade da GR**

A atividade da GR foi determinada por espectrofotometria.

#### **3.10.3.1 Atividade em espectrofotômetro**

A atividade da GR foi determinada como descrito por Gomes-Junior et al. (2006), com algumas modificações.

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a glutathione redutase foi determinada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de DTNB (2-ácido nitrobenzóico), 1 mM de GSSG (glutathione oxidada) e 0,1 mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de extrato protéico. A atividade da GR foi estimada pela redução de glutathione oxidada acompanhada por monitoramento na alteração da absorbância a 412 nm por 1 minuto. Os valores de atividade foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

#### **3.10.4 Atividade da APX**

A atividade da APX foi determinada por espectrofotometria.

#### **3.10.4.1 Atividade em espectrofotômetro**

A atividade de APX foi determinada como descrito por Moldes et al. (2008).

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a ascorbato peroxidase foi determinada em solução contendo 650  $\mu\text{L}$  tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0), 100  $\mu\text{L}$  ascorbato 5 mM, 100  $\mu\text{L}$  EDTA 1 mM, e extrato protéico, permanecendo em banho a 30°C. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{L}$  1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi adicionado na hora da leitura, que foi monitorada durante 1 minuto em cubetas de quartzo a 290 nm. Os valores de atividade foram expressos em nmol/minuto/mg de proteína.

#### **3.10.5 Atividade da GPOX**

A atividade da GPOX foi determinada por espectrofotometria.

##### **3.10.5.1 Atividade em espectrofotômetro**

A atividade de GPOX foi determinada como descrito por Matsuno e Uritani (1972), padronizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado.

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, o ensaio foi conduzido em uma mistura de reação contendo 780  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato-citrato (solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0), 50  $\mu\text{L}$  de guaiacol a 0,5% e extrato protéico, sendo misturados em vortex. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e misturados novamente em vortex. Posteriormente, esta mistura foi incubada a 30°C por 15 minutos. Em seguida, após a incubação, a mistura foi colocada em banho de gelo adicionando-se a mesma 50  $\mu\text{L}$  de solução de metabissulfito de sódio a 2% e deixada em repouso por 10 minutos. As leituras foram realizadas a 450 nm. Os valores de atividade foram expressos em unidades da enzima.

#### **3.11 Análise densitométrica dos géis de atividade enzimática**

Para os géis de atividade enzimática da SOD foi realizada análise densitométrica (intensidade) de cada banda, com o auxílio do programa Kodak Digital Science – 1D Image

Analysis Software versão 3.0.1. O resultado da intensidade das bandas foi dado em pixels, porém, para uma melhor discussão, esses números foram transformados em porcentagem.

### **3.12 Análise das concentrações de Na e Cd em folhas, raiz e frutos**

Para a determinação das concentrações de Na e Cd nos tecidos vegetais foi realizada uma digestão nitro-perclórica em material seco e moído, segundo Malavolta et al. (1997). Mediu-se 250 mg de material seco e moído e colocou-se em um tubo. Posteriormente, adicionado-se 2,5 mL de ácido nítrico concentrado sob temperatura ambiente. Após o repouso por uma noite, os tubos foram aquecidos em bloco digestor (80-100° C) por aproximadamente 3 horas e 30 minutos, para evaporar o ácido nítrico. Em seguida, foi adicionado 500 µL de ácido perclórico concentrado (72%) e a temperatura foi gradativamente aumentada até atingir 200°C, prosseguindo a digestão até a dissipação de vapores emanados do tubo. Posteriormente, foram adicionados 25 mL de água ultrapura e realizada as leituras. Não houve necessidade de filtragem da solução.

As concentrações de Na nos tecidos vegetais foram determinadas em fotômetro de chama Micronal – modelo B462, e as concentrações de Cd foram determinadas em espectrômetro de absorção atômica com chama Perkin Elmer – modelo 3110, equipado com lâmpada cátodos oco de cádmio, com comprimento de onda 229 nm, fenda 0,7 nm, corrente de lâmpada 4 mA e chama de ar e acetileno. Os valores de concentração foram expressos em mmol por grama de tecido seco.

### **3.13 Delineamento Experimental**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições e utilizadas duas repetições com valores mais próximos para análise estatística. Aos dados quantitativos foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Média (TUKEY), utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System – Proc GLM) a 5% de probabilidade.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise de matéria seca e de clorofila por SPAD

O estresse salino pode provocar mudanças no crescimento, morfologia e fisiologia da raiz, alterando a absorção de água, de íons e a intensidade de sinalização (hormônios) à parte aérea. Segundo os dados das figuras 7 e 11 a 13, houve redução de massa seca da folha com 20 e 36 dias de exposição ao NaCl para ambos os genótipos. Os resultados de massa seca da raiz (Figura 8), não mostraram alterações significativas para ambos os genótipos durante o desenvolvimento das plantas em exposição ao NaCl. A massa seca em fruto não variou entre os genótipos no tratamento com NaCl em relação aos controles (Figura 9). Nos resultados apresentados na figura 10, não houve alterações significativas para ambos os genótipos nos teores de clorofila medidos por SPAD ao longo do desenvolvimento das plantas.

Em plantas, o Cd provoca diminuição da síntese de clorofila e subsequente reflexo na taxa de fotossíntese. Nos resultados apresentados para o CdCl<sub>2</sub>, houve diminuição da massa seca da folha de MT e Nr aos 20 e 36 dias de exposição ao tratamento se comparado ao seu controle (Figuras 7 e 11 a 13). A análise de massa seca da raiz não apresentou alterações para ambos os genótipos submetidos ao CdCl<sub>2</sub>, em relação aos seus controles (Figura 8), assim como para a massa seca de fruto (Figura 9). O teor do pigmento presente na folha (Figura 10) apresentou diferenças aos 28 e 35 dias de exposição ao CdCl<sub>2</sub>, principalmente para o genótipo MT.



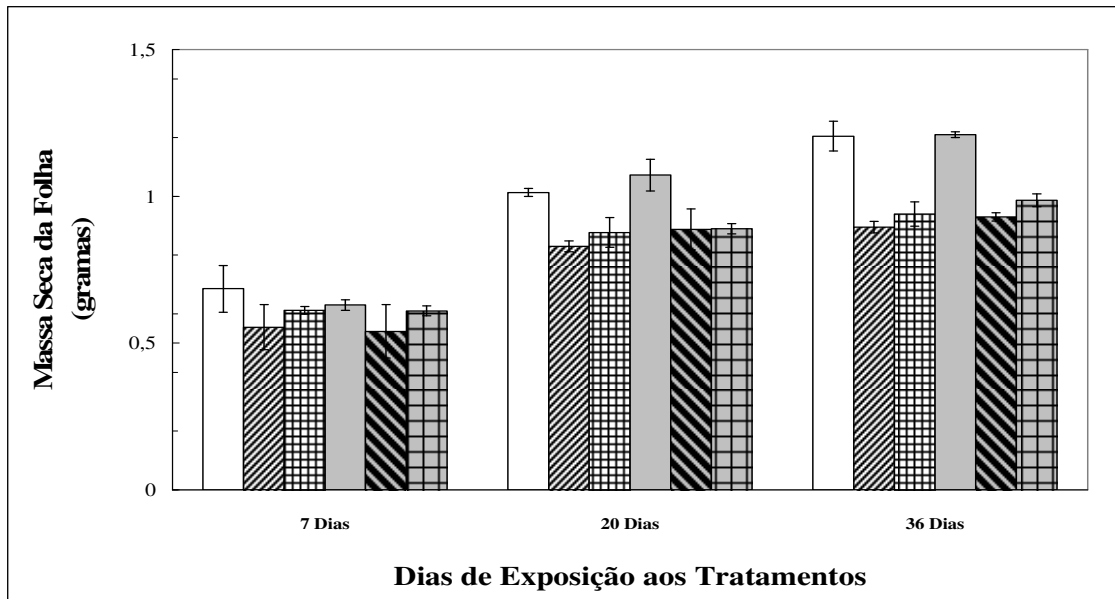


Figura 7 - Massa seca da folha de plantas de MT e Nr após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); Nr controle 0 mM (■); Nr 100 mM de NaCl (▤); Nr 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▪)

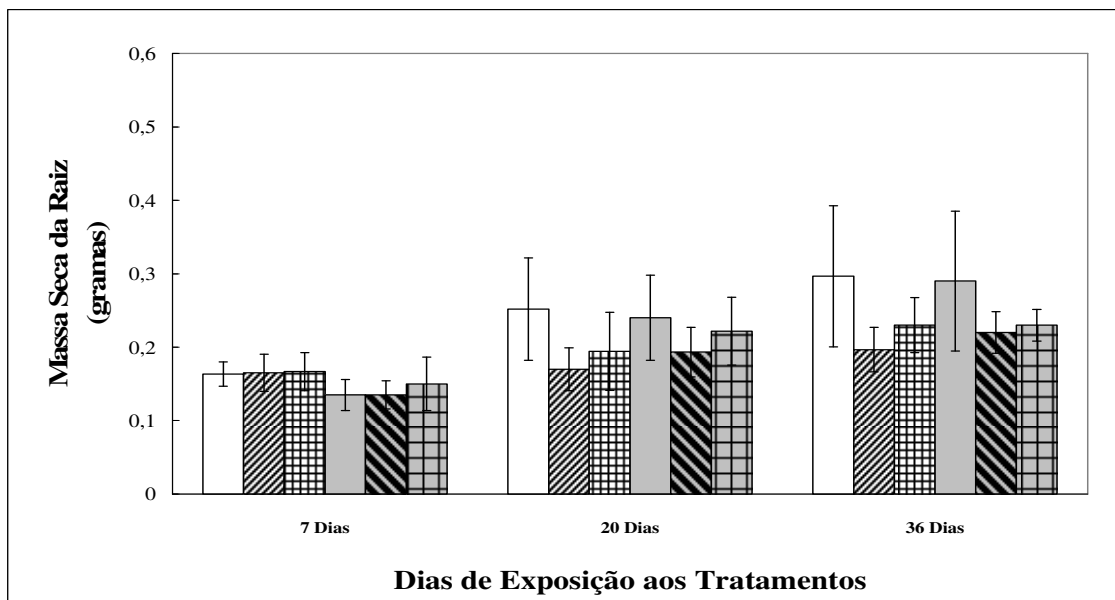


Figura 8 - Massa seca da raiz de plantas de MT e Nr após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); Nr controle 0 mM (■); Nr 100 mM de NaCl (▤); Nr 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▪)

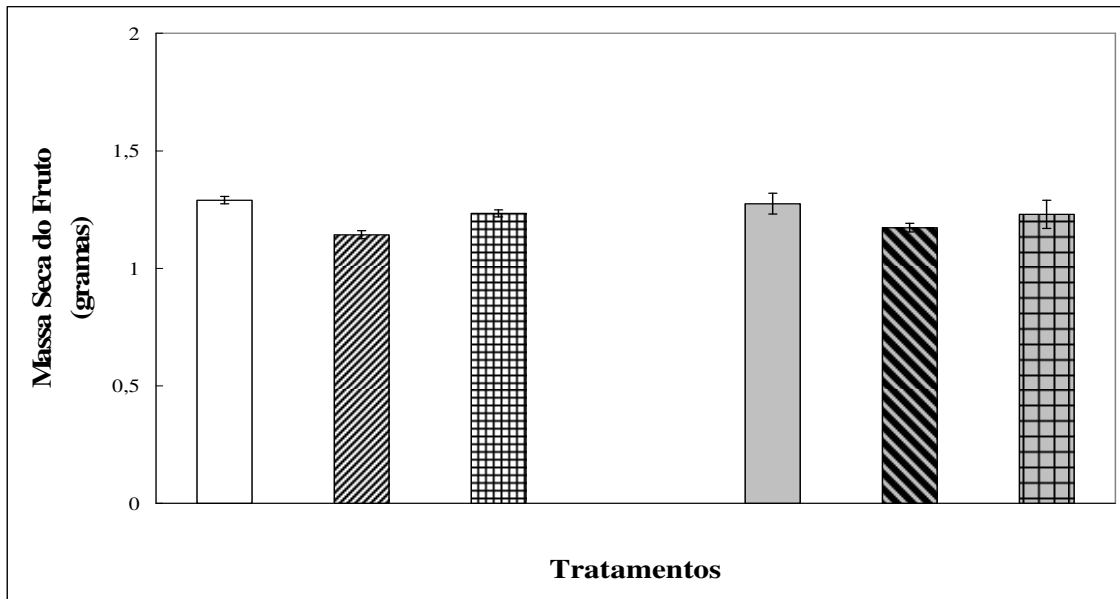


Figura 9 - Massa seca do fruto de plantas de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▩); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩)

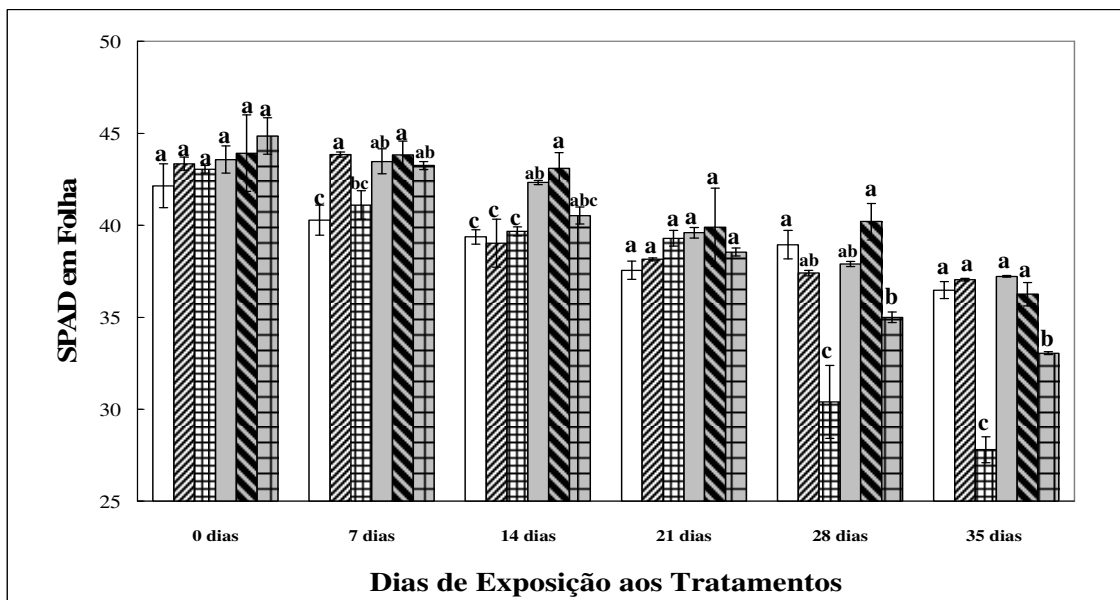


Figura 10 - SPAD em folha de plantas de MT e *Nr* após zero, sete, 14, 21, 28 e 35 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▩); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩)

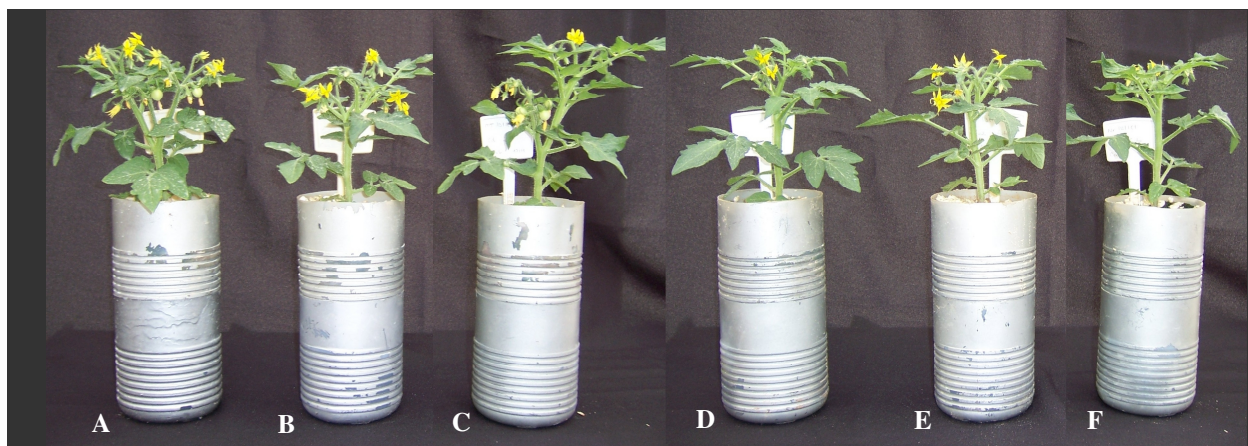


Figura 11 - Efeito dos tratamentos em plantas de MT e *Nr* sete dias após a exposição aos tratamentos. A. MT Controle; B. MT 100 mM de NaCl; C. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; D. *Nr* Controle; E. *Nr* 100 mM de NaCl; F. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

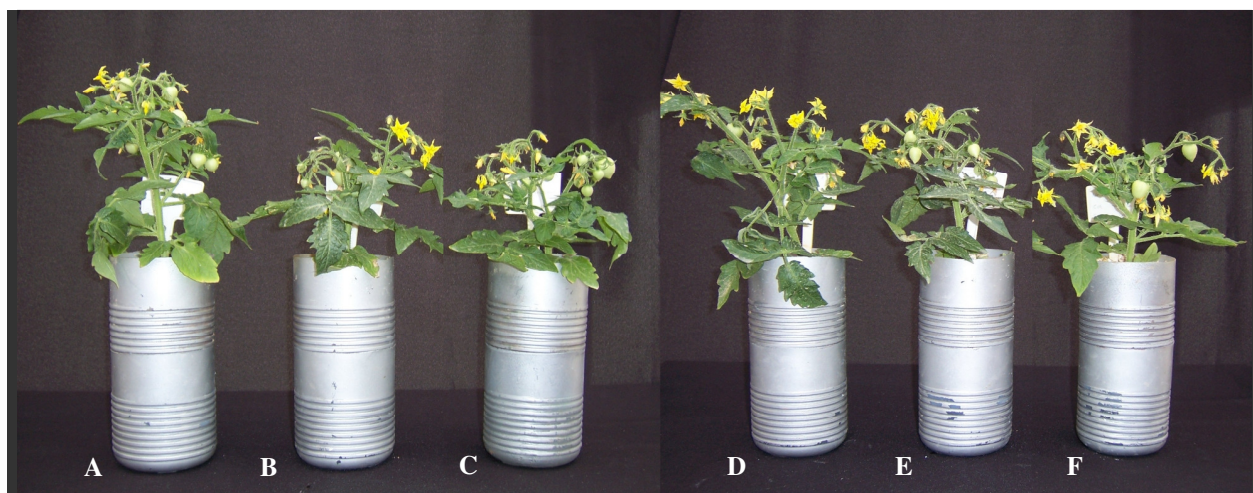


Figura 12 - Efeito dos tratamentos em plantas de MT e *Nr* 20 dias após a exposição aos tratamentos. A. MT Controle; B. MT 100 mM de NaCl; C. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; D. *Nr* Controle; E. *Nr* 100 mM de NaCl; F. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

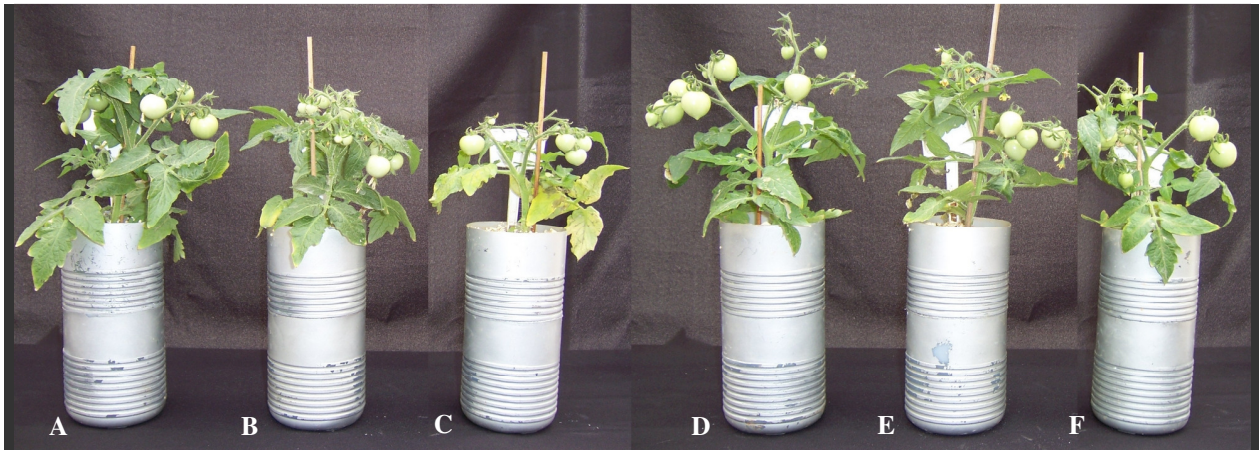


Figura 13 - Efeito dos tratamentos em plantas de MT e *Nr* 36 dias após a exposição aos tratamentos. A. MT Controle; B. MT 100 mM de NaCl; C. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; D. *Nr* Controle; E. *Nr* 100 mM de NaCl; F. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

#### 4.2 Perfil protéico em SDS-PAGE

Na análise dos géis de folha, raiz e fruto foram observados mudanças no perfil protéico em relação aos controles. Tais diferenças estão relacionadas a alterações de intensidade e ausência/ presença de bandas entre os materiais.

Em folha, na figura 14, foi observado o aparecimento da banda II para o MT tratado com NaCl e intensidade diferente para todos os tratamentos nas bandas V, VII e IX. O perfil protéico mostrado na figura 15 apresentou ausência da banda I para o MT tratado com NaCl e CdCl<sub>2</sub> e diferença de intensidade dessa banda para o *Nr* tratado com NaCl e CdCl<sub>2</sub>. As bandas II e V apresentaram diferença de intensidade nos tratamentos com NaCl e CdCl<sub>2</sub> para ambos genótipos. A banda VI apareceu nos tratamentos do MT e do *Nr*. Na figura 16, a banda I foi observada somente nos controles MT e *Nr*, e a banda II apresentou-se menos intensa para os dois genótipos tratados com NaCl e ausência para os dois genótipos tratados com CdCl<sub>2</sub>. Já a banda III apareceu nos dois genótipos tratados com CdCl<sub>2</sub> e para o MT tratado com NaCl. A banda IV apresentou-se menos intensa para o *Nr* tratado com NaCl. A banda V apresentou ausência nos dois genótipos tratados com CdCl<sub>2</sub>. No MT tratado com CdCl<sub>2</sub>, a banda VII apresentou-se menos intensa que nos outros tratamentos e no outro genótipo em relação aos controles. Em geral, tanto o MT quanto o *Nr* tratado com CdCl<sub>2</sub> apresentaram bandas menos intensas que os controles e as plantas tratadas com NaCl.

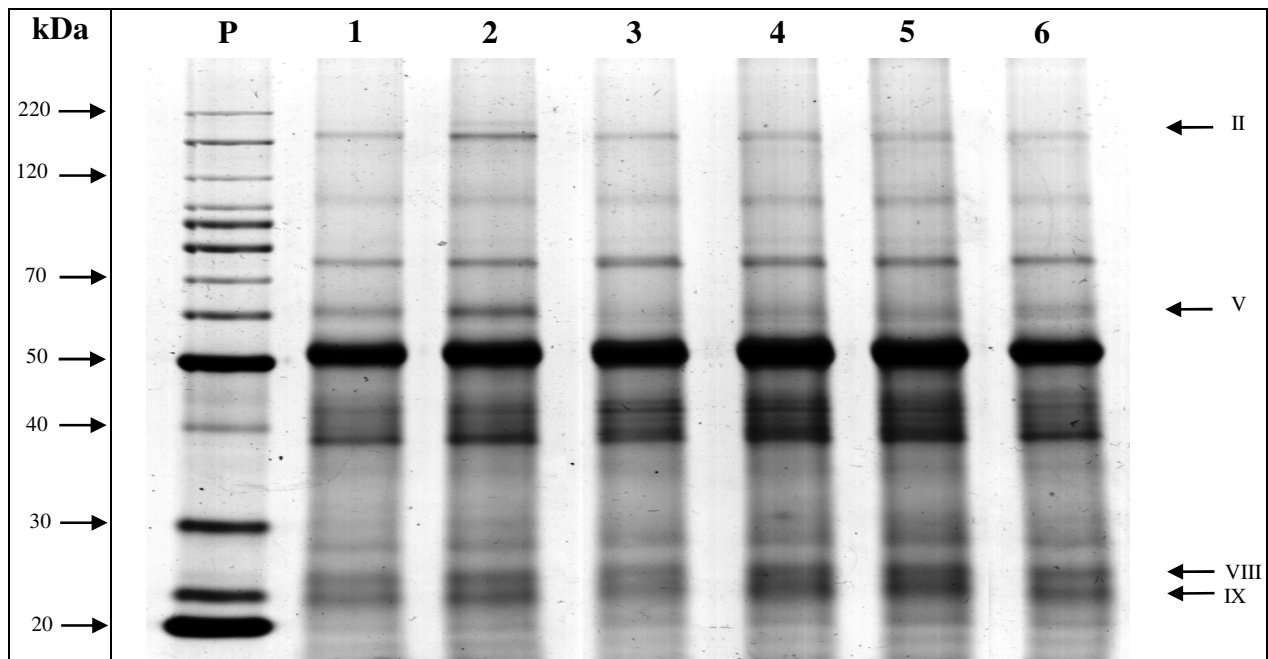


Figura 14 - SDS-Page em folha de MT e *Nr* sete dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão BSA; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

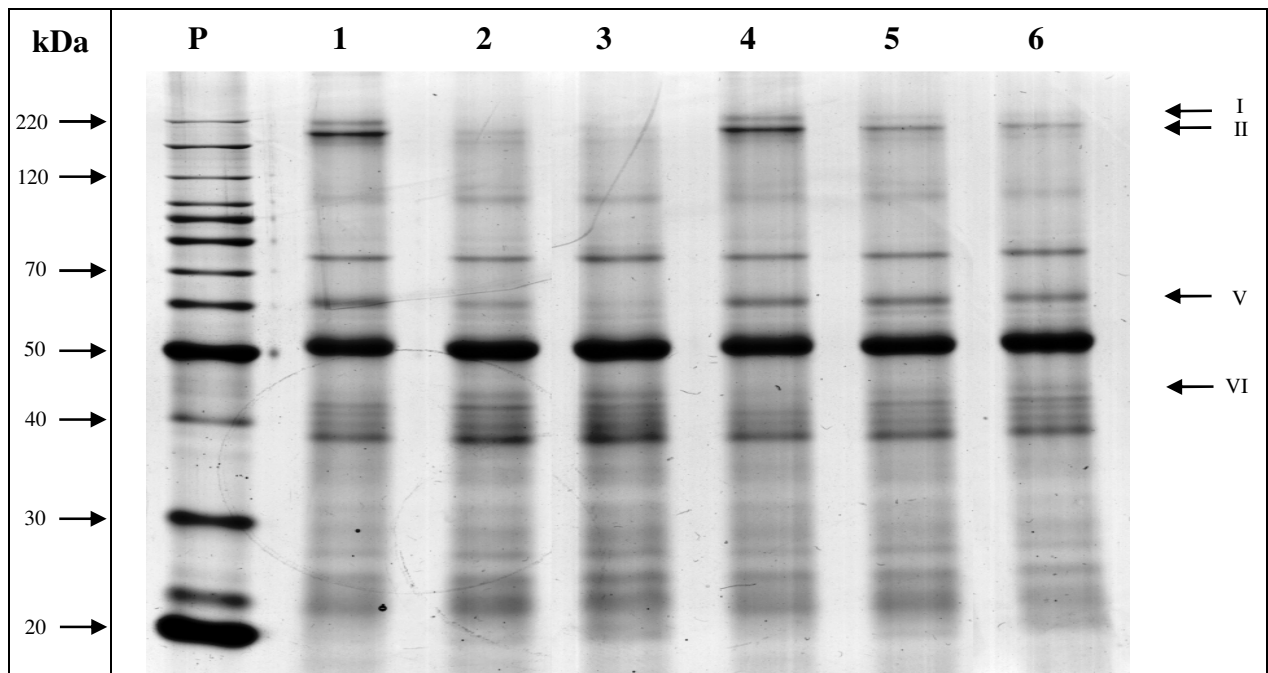


Figura 15 - SDS-Page em folha de MT e *Nr* 20 dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão BSA; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

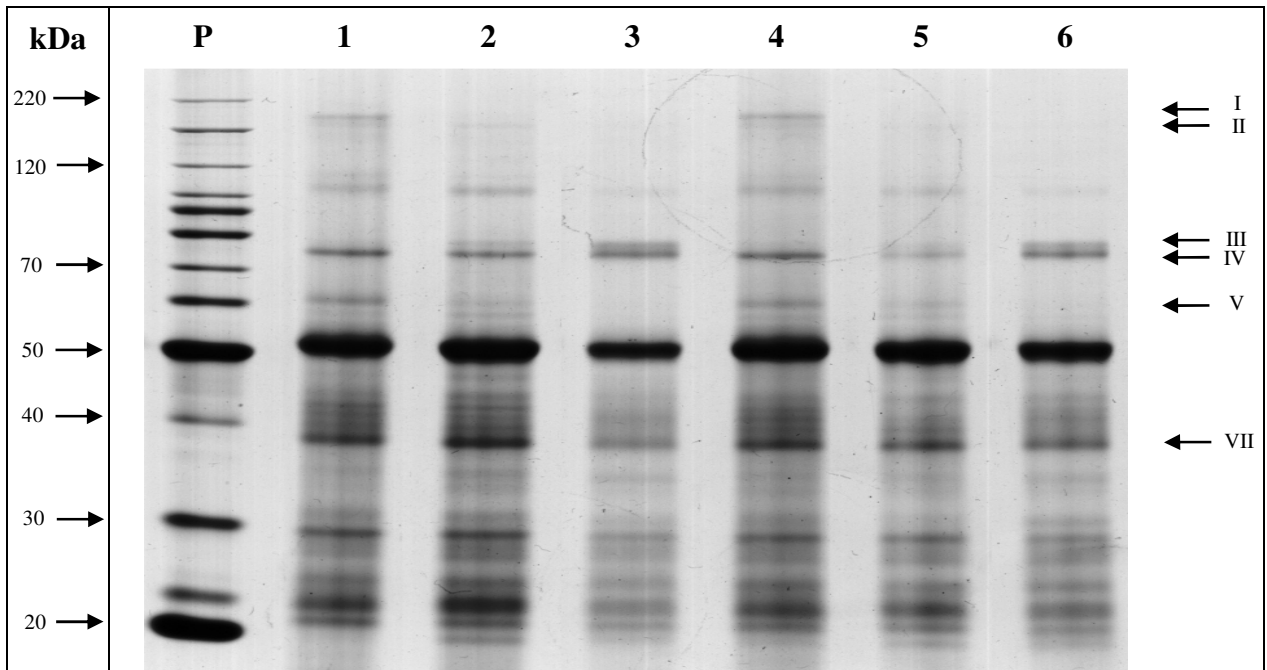


Figura 16 - SDS-Page em folha de MT e *Nr* 36 dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão BSA; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

Para os perfis protéicos de raiz, apresentados nas figuras de 17 a 19, ocorreu diferença na intensidade das bandas. Na figura 17, as bandas I, II e III apresentaram maior intensidade para os tratamentos dos dois genótipos com CdCl<sub>2</sub>, em relação aos controles. Para as plantas tratadas com NaCl, a banda III apresentou-se mais intensa quando comparados aos seus controles. A figura 18 apresentou a banda I com menor intensidade tanto para o MT quanto para o *Nr* tratados com NaCl. O MT tratado com NaCl apresentou a banda V mais intensa que seu controle, ao contrário do *Nr*. Já a banda VI apresentou-se mais intensa nas plantas tratadas com CdCl<sub>2</sub> quando comparadas aos seus controles. Aos 36 dias (Figura 19), o perfil protéico de raiz apresentou menor intensidade de bandas para o MT tratado com CdCl<sub>2</sub>, ao contrário do *Nr*, quando comparados aos seus controles, mostradas pelas bandas III, IV, V e VI.

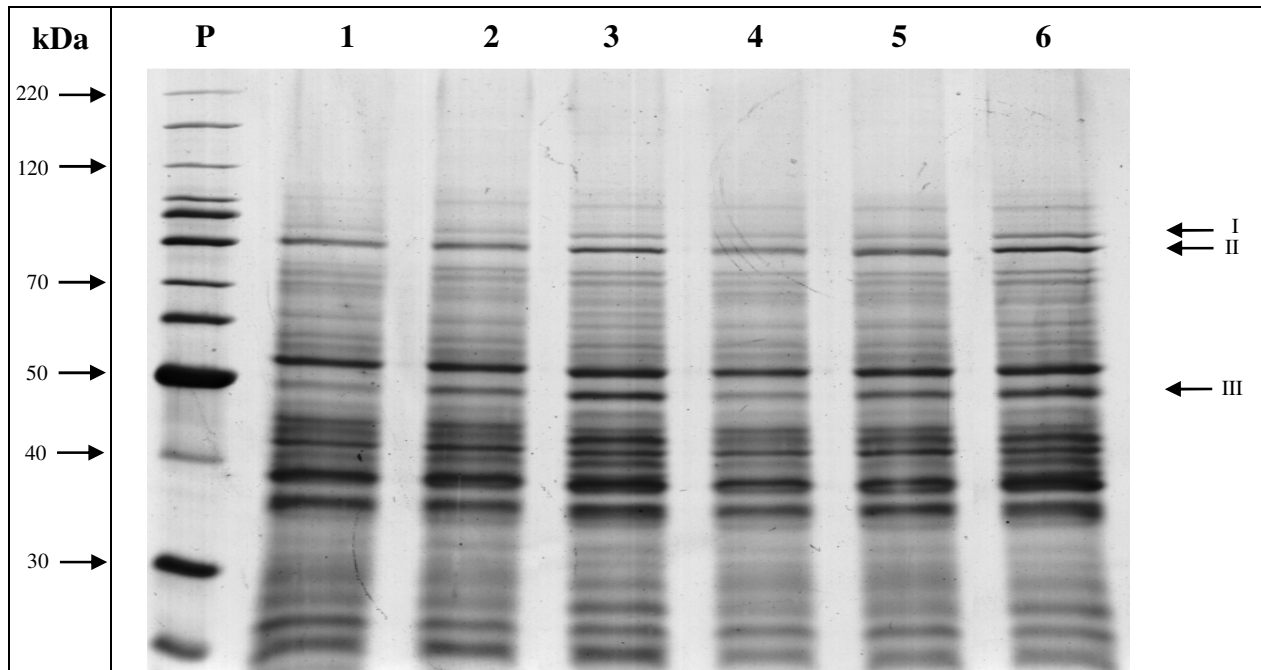


Figura 17 - SDS-Page em raiz de MT e *Nr* sete dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão BSA; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

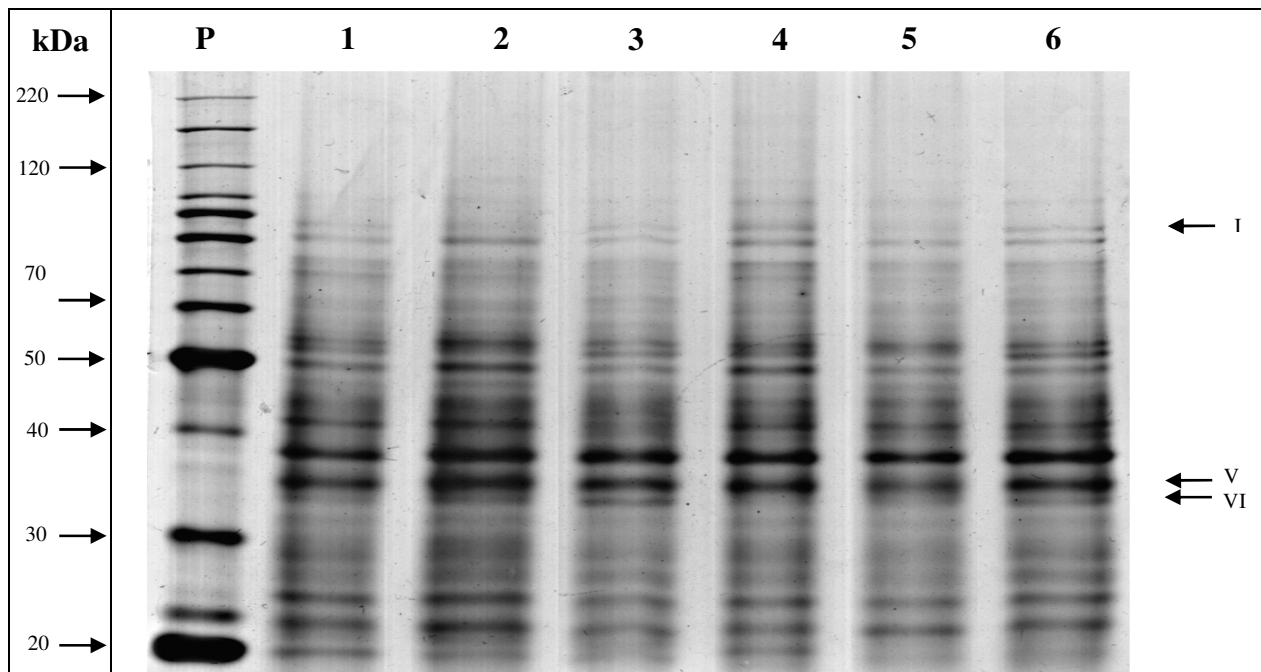


Figura 18 - SDS-Page em raiz de MT e *Nr* 20 dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão BSA; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

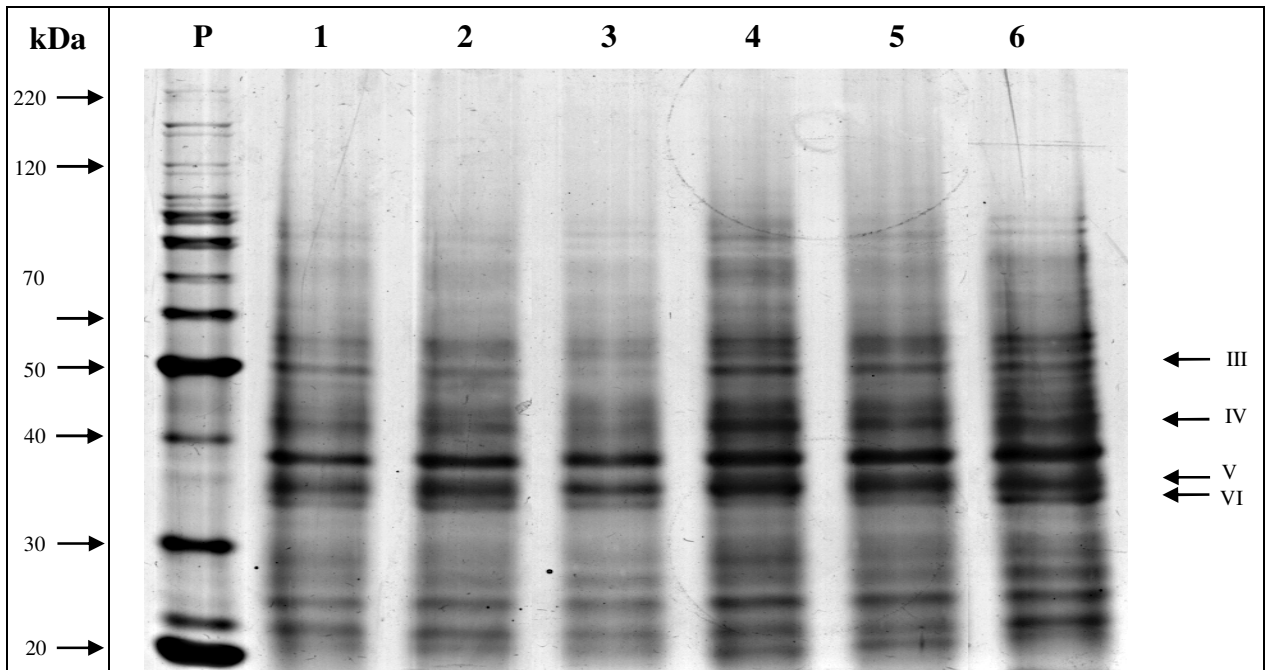


Figura 19 - SDS-Page em raiz de MT e *Nr* 36 dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão BSA; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

Para fruto, a figura 20 mostra o perfil protéico com poucas alterações entre os genótipos e tratamentos. O *Nr* controle apresentou maior intensidade de bandas quando comparados com os outros tratamentos (bandas I, II, III e IV).



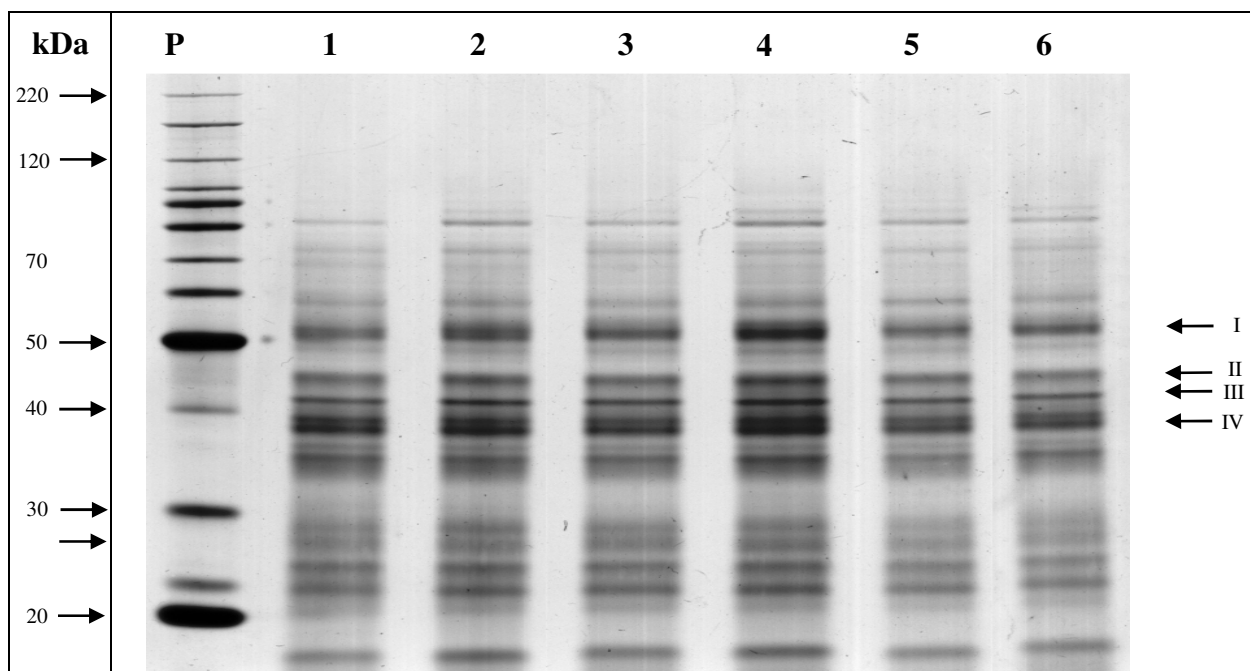


Figura 20 - GSDS-Page em fruto de MT e *Nr* 36 dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão BSA; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

Os perfis protéicos de folha, raiz e fruto apresentaram diferenças entre as bandas com maior intensidade que se repetem aos sete, 20 e 36 dias na folha, pois são de mesma massa molecular, diferentemente dos perfis de raiz e fruto. De maneira geral, os tratamentos com NaCl e com CdCl<sub>2</sub> apresentaram maiores diferenças em folha e raiz aos 36 dias, quando comparados aos seus controles.

#### 4.3 Quantificação de malondialdeído (MDA) em espectrofotômetro

As EAOs reagem com ácidos graxos insaturados e causam a peroxidação de lipídeos nas membranas, indicada como aumento no conteúdo de MDA. Em plantas submetidas ao estresse por NaCl, pôde-se observar o aumento do conteúdo de MDA ao longo do seu desenvolvimento, sendo mais evidente aos 36 dias de exposição na folha para ambos os genótipos, quando comparados aos seus controles (Figura 21). Porém, notou-se aumento do conteúdo de MDA também na raiz e no fruto aos 36 dias de exposição, principalmente no MT (Figuras 22 e 23).

O Cd causa desordens oxidativas em plantas, evidenciadas pelo aumento da peroxidação lipídica. Em folha, o aumento no conteúdo de MDA foi observado ao longo do desenvolvimento

dos genótipos, quando comparado aos seus controles (Figura 21). Para a raiz, o aumento do conteúdo de MDA ocorreu aos sete dias de exposição em MT e aos 36 dias de exposição para o *Nr*, quando comparado aos seus controles (Figura 22). Em fruto, não foi observado aumento significativo no conteúdo de MDA para ambos os genótipos (Figura 23).

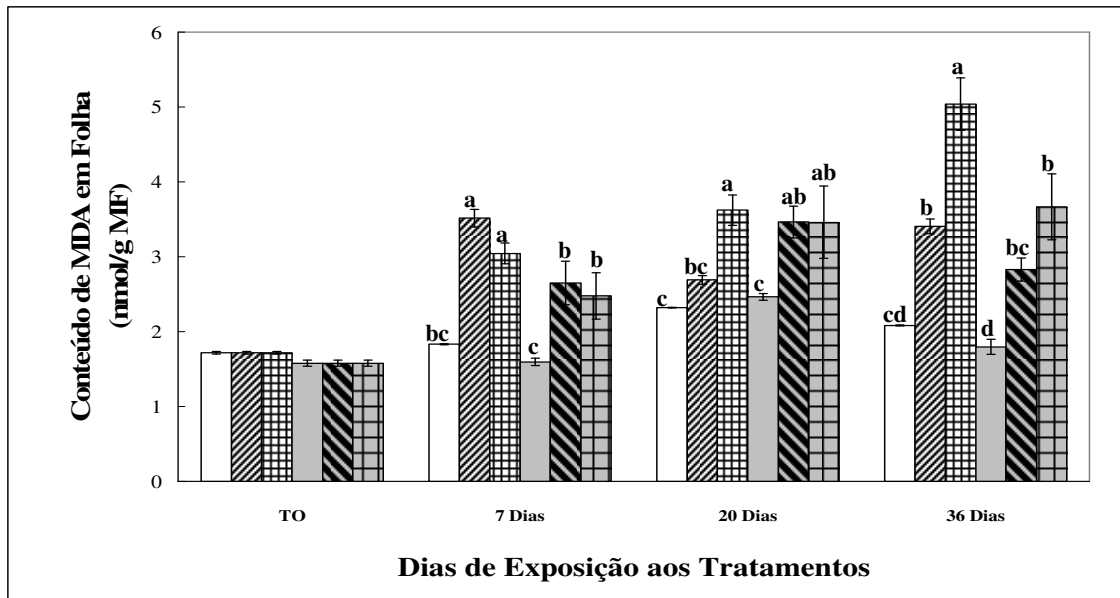


Figura 21 - Conteúdo de MDA em matéria fresca de folha de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▤); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▧)

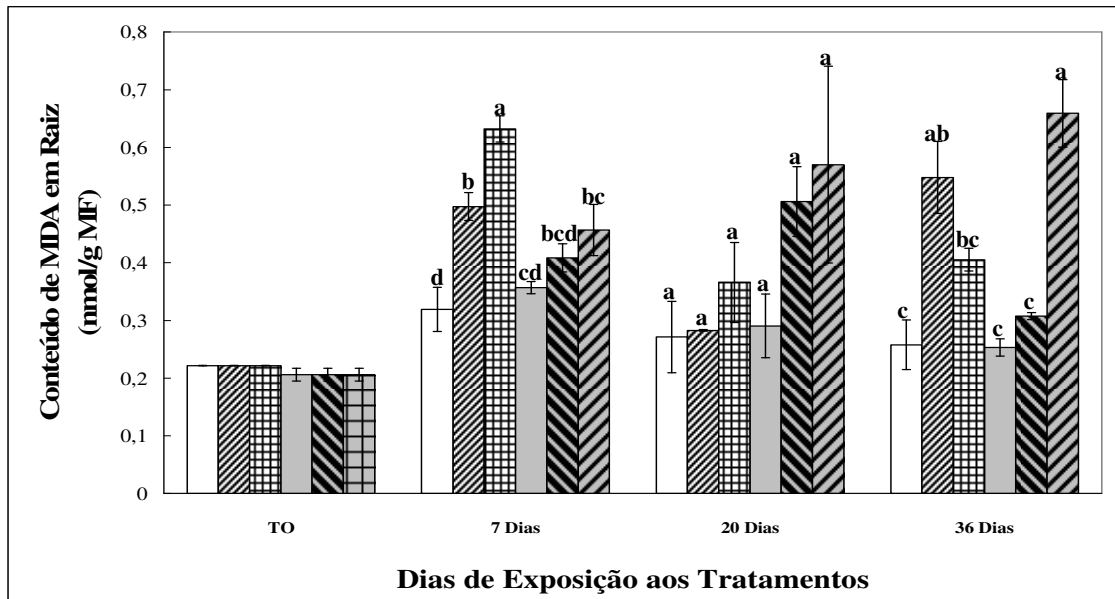


Figura 22 - Conteúdo de MDA em matéria fresca de raiz de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▩); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▨)

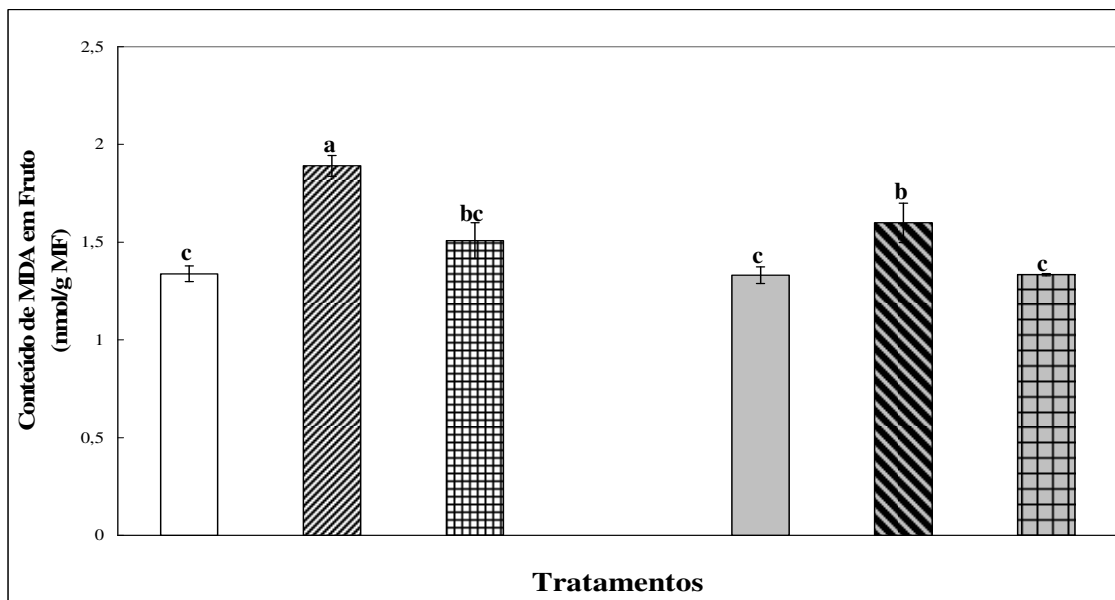


Figura 23 - Conteúdo de MDA em matéria fresca de fruto de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▩); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▨)

#### 4.4 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em espectrofotômetro

O aumento de EAOs nas células de plantas é outro indicador de estresse, assim como o aumento do conteúdo de MDA. Entre as EAOs, o peróxido de hidrogênio é muito estudado por ser um dos principais compostos que aumenta quando ocorre algum estresse na célula. O aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode regular a atividade de diversas enzimas antioxidantes, como a CAT e a APX. Pela análise do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observou-se aumento para o MT e para o *Nr*, em folha, durante todo o período analisado, tanto para o tratamento com NaCl quanto para o tratamento com Cd (Figura 24). Em raiz, o aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi observado aos sete e 20 dias para ambos os genótipos e tratamentos. Porém, aos 36 dias, tanto o MT quanto o *Nr* tratados com NaCl não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus controles, diferentemente do tratamento com CdCl<sub>2</sub> que apresentou do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentos significativos para os dois genótipos (Figura 25). Em fruto, observou-se aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o genótipo *Nr* nos dois tratamentos, e o MT apresentou diferença significativa para os tratamentos somente quando comparado ao seu controle (Figura 26).

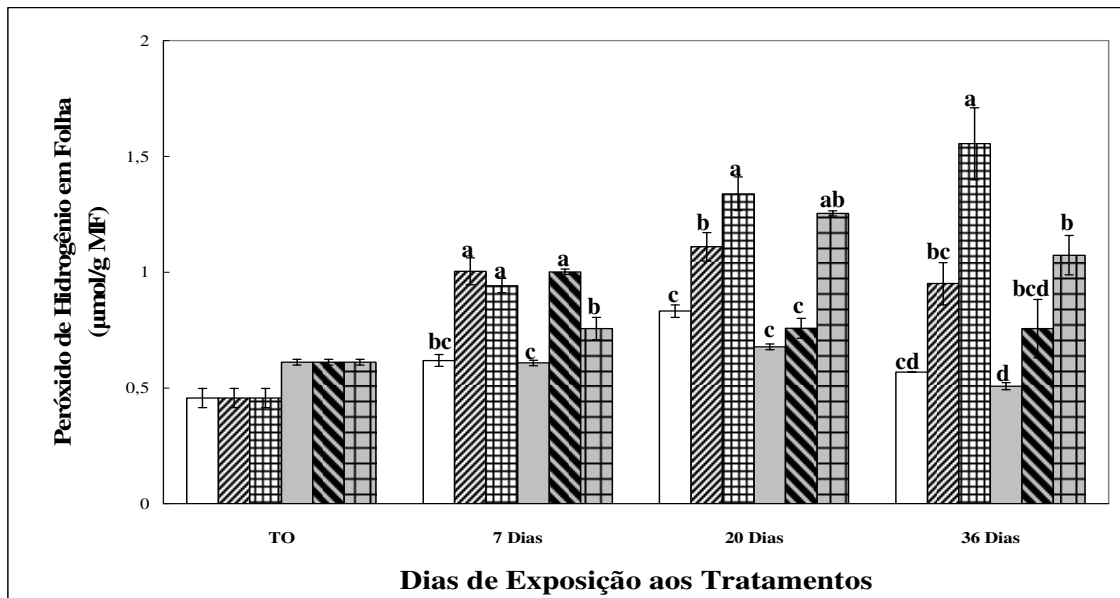


Figura 24 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em matéria fresca de folha de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▤); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▧)

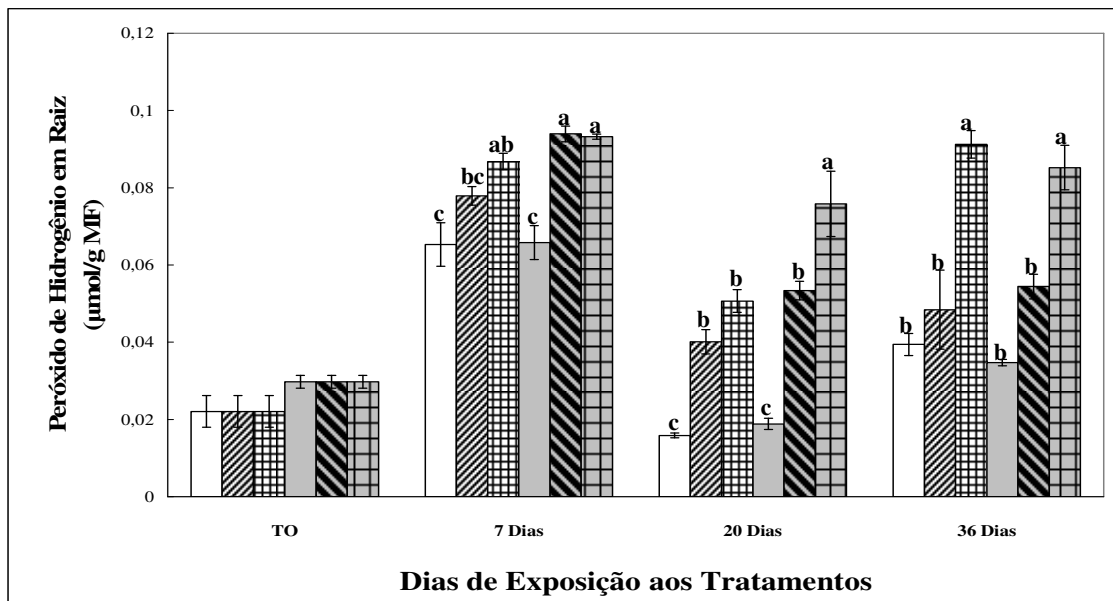


Figura 25 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em matéria fresca de raiz de MT e Nr após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM ( $\square$ ); MT 100 mM de NaCl ( $\text{▨}$ ); MT 0,5 mM de  $CdCl_2$  ( $\text{▩}$ ); Nr controle 0 mM ( $\square$ ); Nr 100 mM de NaCl ( $\text{▩}$ ); Nr 0,5 mM de  $CdCl_2$  ( $\text{▩}$ )

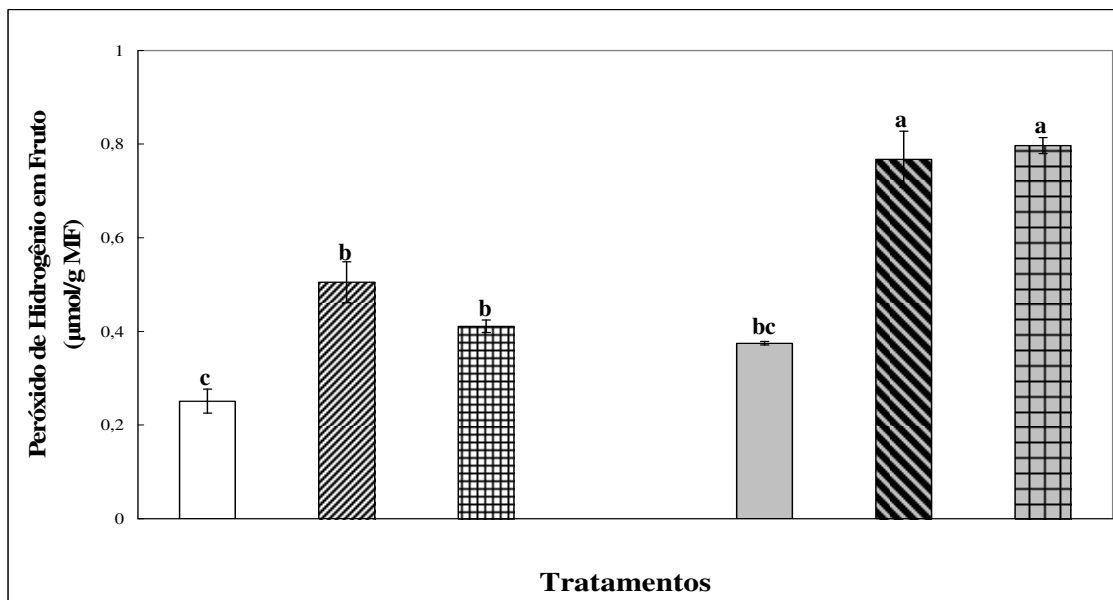


Figura 26 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em matéria fresca de fruto de MT e Nr após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM ( $\square$ ); MT 100 mM de NaCl ( $\text{▨}$ ); MT 0,5 mM de  $CdCl_2$  ( $\text{▩}$ ); Nr controle 0 mM ( $\square$ ); Nr 100 mM de NaCl ( $\text{▩}$ ); Nr 0,5 mM de  $CdCl_2$  ( $\text{▩}$ )

## 4.5 Análises das enzimas antioxidantes

Nos itens seguintes serão apresentados os resultados obtidos para cada enzima analisada.

### 4.5.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em PAGE

A superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa contra as EAOs, agindo contra o radical superóxido, transformando-o em  $H_2O_2$  e água. A SOD foi analisada através de gel de poliacrilamida não desnaturante (PAGE) e da análise densitométrica de cada banda.

Três isoformas de SOD foram observadas nos dois genótipos e nos três tempos e tecidos analisados. Em folha aos sete dias e vinte dias, os tratamentos no MT induziram ao aumento da intensidade nas três isoformas quando comparado ao seu controle, enquanto que no *Nr* exposto ao  $CdCl_2$ , as isoformas apresentaram menor intensidade, como também para as isoformas I e II no *Nr* tratado com NaCl. Aos 36 dias, em folha, notou-se intensidade da isoforma I menor para os dois genótipos tratados com NaCl e aumento nos tratamentos com  $CdCl_2$ . Para a isoforma II, observou-se aumento de intensidade para o MT exposto ao NaCl e para o *Nr* tratado com  $CdCl_2$ , e menor intensidade para o MT tratado com  $CdCl_2$  e para o *Nr* tratado com NaCl. A isoforma III apresentou maior intensidade para todos os tratamentos, exceto para o MT tratado com  $CdCl_2$ , quando comparados aos seus controles (Figura 27 e Tabela 2). As isoformas foram determinadas através da inibição por KCN e/ou por  $H_2O_2$ . A isoforma I foi caracterizada como Mn-SOD (resistente a presença de KCN e  $H_2O_2$ ) presente nas mitocôndrias, a isoforma II como Fe-SOD (resistente a KCN e inativada na presença de  $H_2O_2$ ) presente no cloroplasto, e a isoforma III como Cu/Zn-SOD (inativada na presença de KCN e  $H_2O_2$ ) presente no citoplasma e no cloroplasto, como apresentado na figura 28.

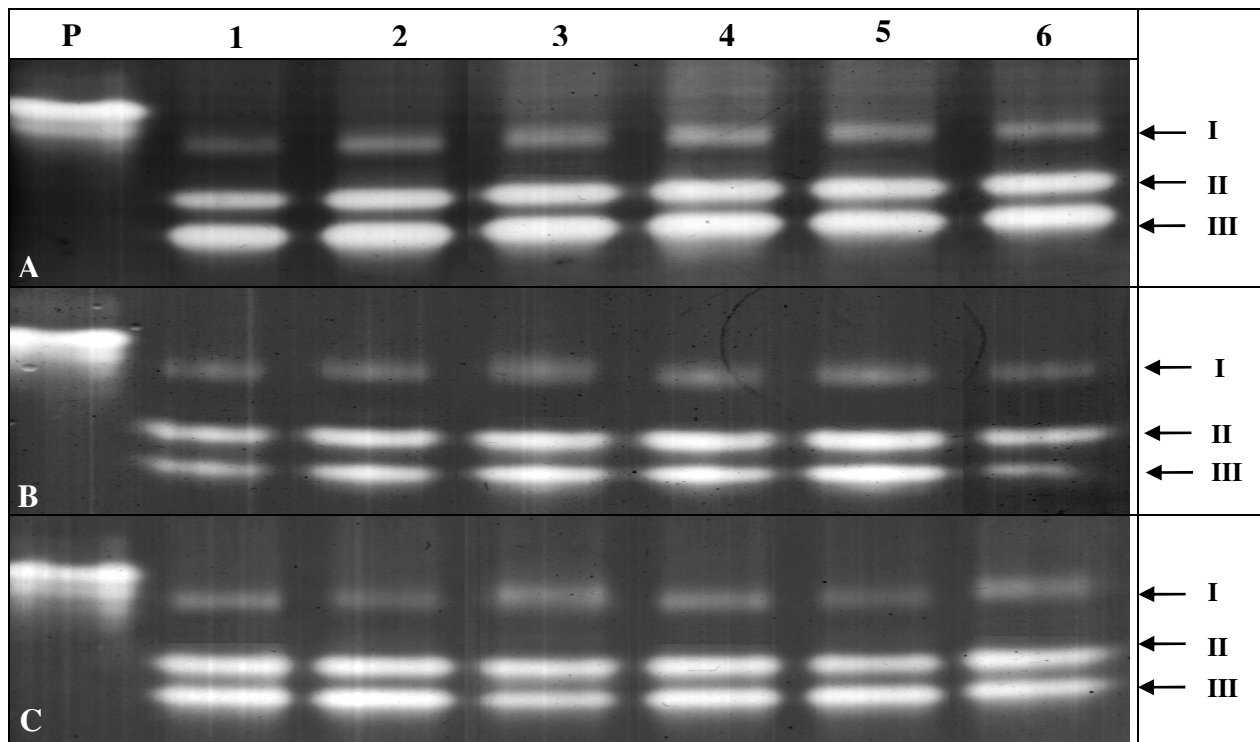


Figura 27 – Atividade específica de SOD em PAGE em folha de MT e *Nr*. A. sete dias; B. 20 dias; C. 36 dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão SOD bovino; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

Tabela 2 – Análise densitométrica para a atividade de SOD em PAGE em folha de MT e *Nr* aos sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. Os valores tabulados correspondem à variação da intensidade em relação aos seus respectivos controles para cada isoforma

| Folha   | Isoformas | MT       |                   | <i>Nr</i> |                   |
|---------|-----------|----------|-------------------|-----------|-------------------|
|         |           | NaCl     | CdCl <sub>2</sub> | NaCl      | CdCl <sub>2</sub> |
| 7 dias  | SOD I     | + 71,87% | + 97,43%          | - 18,61%  | - 29,10%          |
|         | SOD II    | + 52,95% | + 52,44%          | - 13,19%  | - 11,04%          |
|         | SOD III   | + 12,55% | + 12,54%          | + 2,11%   | - 4,30%           |
| 20 dias | SOD I     | + 14,20% | + 21,03%          | - 2,97%   | - 24,07%          |
|         | SOD II    | + 28,91% | + 49,28%          | - 2,07%   | - 34,19%          |
|         | SOD III   | + 50,43% | + 66,37%          | + 20,40%  | - 52,29%          |
| 36 dias | SOD I     | - 10,24% | + 37,89%          | - 14,00%  | + 16,86%          |
|         | SOD II    | + 6,96%  | - 11,37%          | - 24,41%  | + 1,76%           |
|         | SOD III   | + 13,19% | - 18,02%          | + 3,10%   | + 1,91%           |

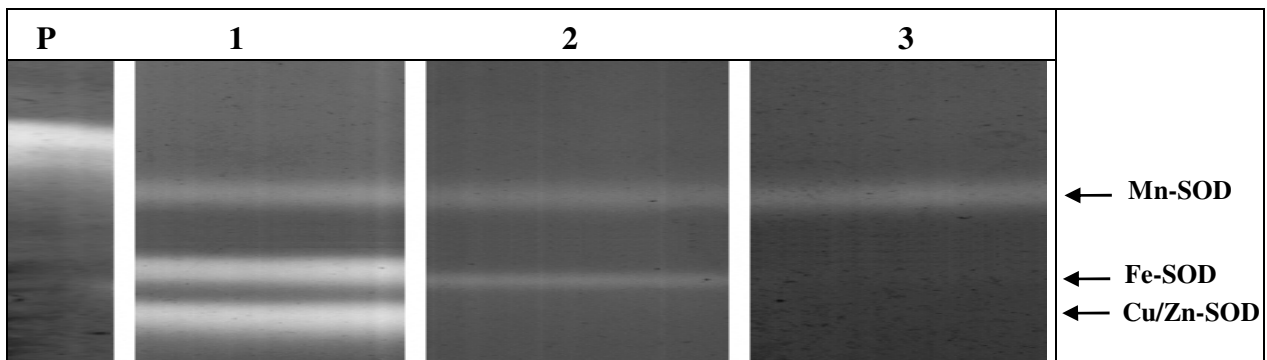


Figura 28 – Determinação das isoformas de SOD em PAGE em folha. P. Padrão SOD bovino; 1. MT controle 20 dias na condição padrão; 2. MT controle 20 dias com KCN; 3. MT controle 20 dias com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para raiz, aos sete dias a isoforma I apresentou maior intensidade para todos os tratamentos, exceto para o MT tratado com CdCl<sub>2</sub>. A isoforma II apresentou aumento de intensidade em todos os tratamentos, ao contrário da isoforma III que apresentou intensidade menor para todos os tratamentos, exceto para o MT tratado com NaCl. Aos 20 dias, a isoforma I apresentou aumento de intensidade para os tratamentos do MT e decréscimo para os tratamentos do *Nr*. A isoforma II apresentou menor intensidade para todos os tratamentos, exceto para o MT



exposto ao NaCl. A isoforma III apresentou aumento nos tratamentos com NaCl e decréscimo nos tratamentos com  $\text{CaCl}_2$ .com 36 dias, o MT apresentou maior intensidade na isoforma I que seu controle, e o *Nr* apresentou decréscimo de intensidade nos tratamentos. A isoforma II apresentou menor intensidade em todos os tratamentos, exceto no MT exposto ao NaCl, que apresentou aumento de intensidade. As plantas tratadas com NaCl apresentaram aumento de intensidade na isoforma III quando comparadas ao seus controles, ao contrário das tratadas com  $\text{CdCl}_2$ , que apresentaram menor intensidade que seus controles (Figura 29 e Tabela 3). A isoforma I foi caracterizada como Mn-SOD, a isoforma II como Fe-SOD e a isoforma III como Cu/Zn-SOD, como apresentado na figura 30.

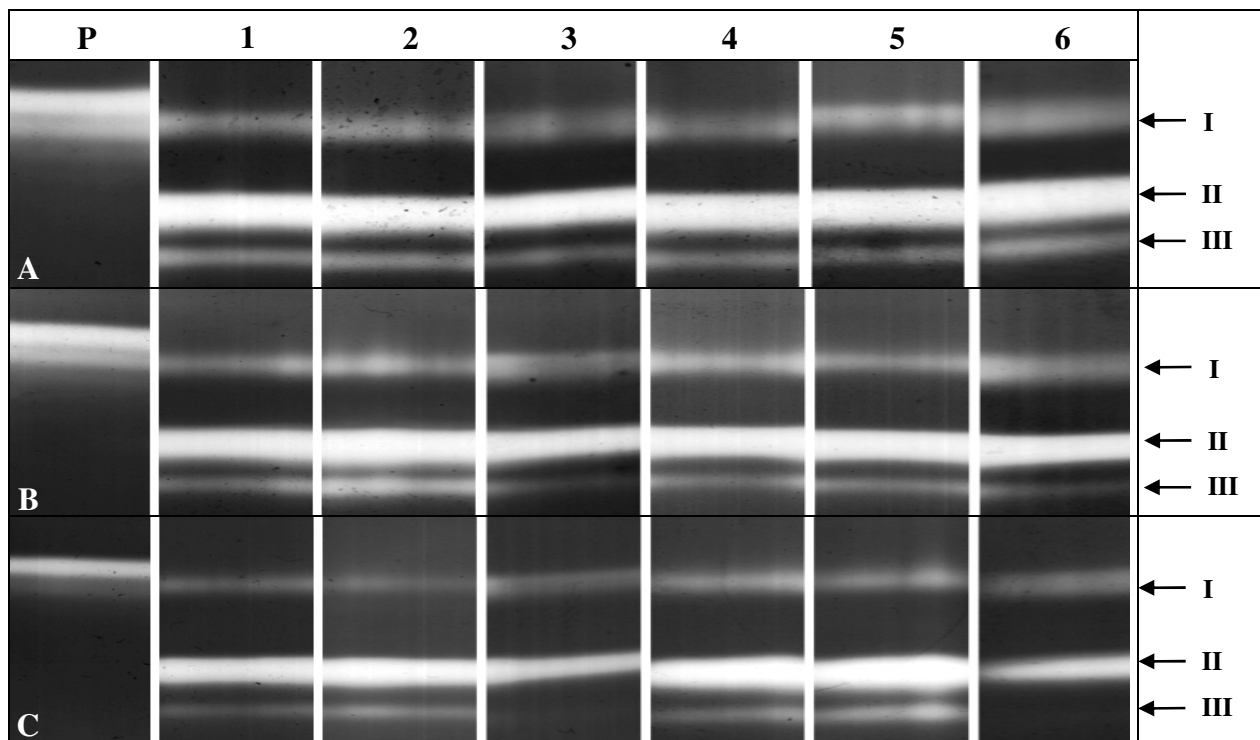


Figura 29 – Atividade específica de SOD em PAGE em raiz de MT e *Nr*. A. sete dias; B. 20 dias; C. 36 dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão SOD bovino; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de  $\text{CdCl}_2$ ; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de  $\text{CdCl}_2$

Tabela 3 – Análise densitométrica para a atividade de SOD em PAGE em raiz de MT e *Nr* aos sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. Os valores tabulados correspondem à variação da intensidade em relação aos seus respectivos controles para cada isoforma

| Raiz    | Isoformas | MT       |                   | <i>Nr</i> |                   |
|---------|-----------|----------|-------------------|-----------|-------------------|
|         |           | NaCl     | CdCl <sub>2</sub> | NaCl      | CdCl <sub>2</sub> |
| 7 dias  | SOD I     | + 18,95% | - 13,92%          | + 9,21%   | + 7,88%           |
|         | SOD II    | + 0,38%  | + 0,70%           | + 1,03%   | + 7,66%           |
|         | SOD III   | + 9,64%  | - 32,51%          | - 22,55%  | - 9,82%           |
| 20 dias | SOD I     | + 32,88% | + 17,16%          | - 14,59%  | - 30,57%          |
|         | SOD II    | + 18,33% | - 2,60%           | - 7,60%   | - 16,26%          |
|         | SOD III   | + 62,84% | - 42,48%          | + 21,75%  | - 52,54%          |
| 36 dias | SOD I     | + 4,36%  | + 32,72%          | - 21,40%  | - 20,74%          |
|         | SOD II    | + 13,66% | - 20,07%          | - 1,47%   | - 25,13%          |
|         | SOD III   | + 63,91% | - 44,65%          | + 23,97%  | - 57,37%          |

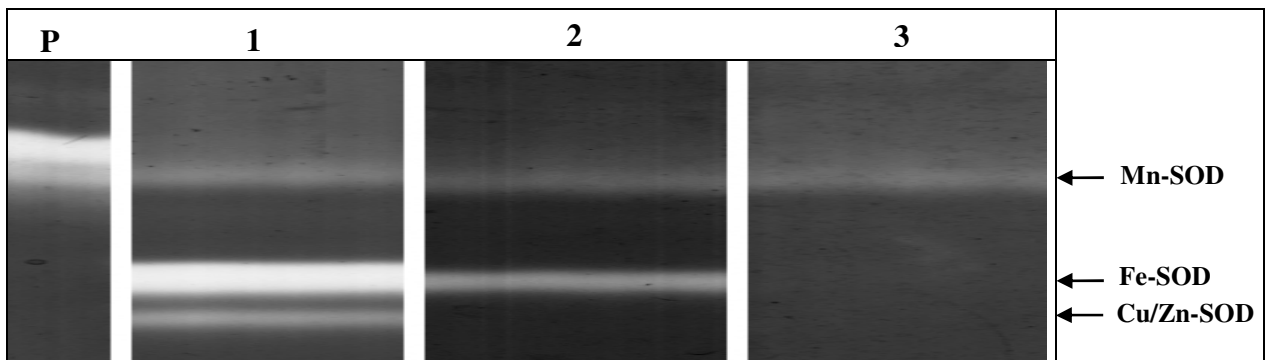


Figura 30 – Determinação das isoformas de SOD em PAGE em raiz. P. Padrão SOD bovino; 1. MT controle 20 dias na condição padrão; 2. MT controle 20 dias com KCN; 3. MT controle 20 dias com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Em fruto, a isoforma I apresentou maior intensidade no MT exposto ao NaCl e no *Nr* exposto ao CdCl<sub>2</sub>. A isoforma II apresentou menor intensidade em todos os tratamentos, exceto para o MT tratado com NaCl. A isoforma III apresentou menor intensidade para todos os tratamentos (Figura 30 e Tabela 4). A isoforma I foi caracterizada como Mn-SOD, a isoforma II como Fe-SOD e a isoforma III como Cu/Zn-SOD, como apresentado na figura 31.

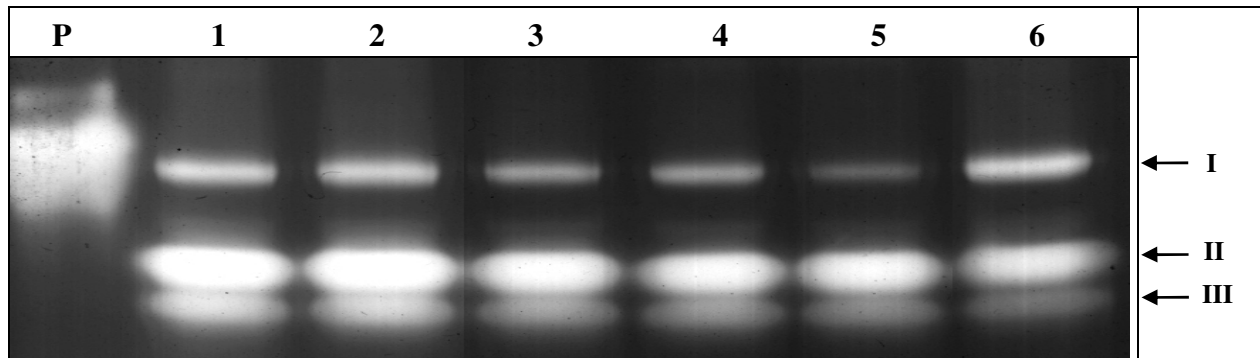


Figura 31 – Atividade específica de SOD em PAGE em fruto de MT e *Nr* aos 36 dias após exposição aos tratamentos. P. Padrão SOD bovino; 1. MT controle 0 mM; 2. MT 100 mM de NaCl; 3. MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; 4. *Nr* controle 0 mM; 5. *Nr* 100 mM de NaCl; 6. *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>

Tabela 4 – Análise densitométrica para a atividade de SOD em PAGE em fruto de MT e *Nr* aos 36 dias de exposição aos tratamentos. Os valores tabulados correspondem à variação da intensidade em relação aos seus respectivos controles para cada isoforma

| Fruto   | Isoformas | MT       |                   | <i>Nr</i> |                   |
|---------|-----------|----------|-------------------|-----------|-------------------|
|         |           | NaCl     | CdCl <sub>2</sub> | NaCl      | CdCl <sub>2</sub> |
| 36 dias | SOD I     | + 4,43%  | - 39,05%          | - 23,19%  | + 83,84%          |
|         | SOD II    | + 12,13% | - 7,91%           | - 9,51%   | - 22,07%          |
|         | SOD III   | - 16,06% | - 29,23%          | - 16,22%  | - 29,14%          |

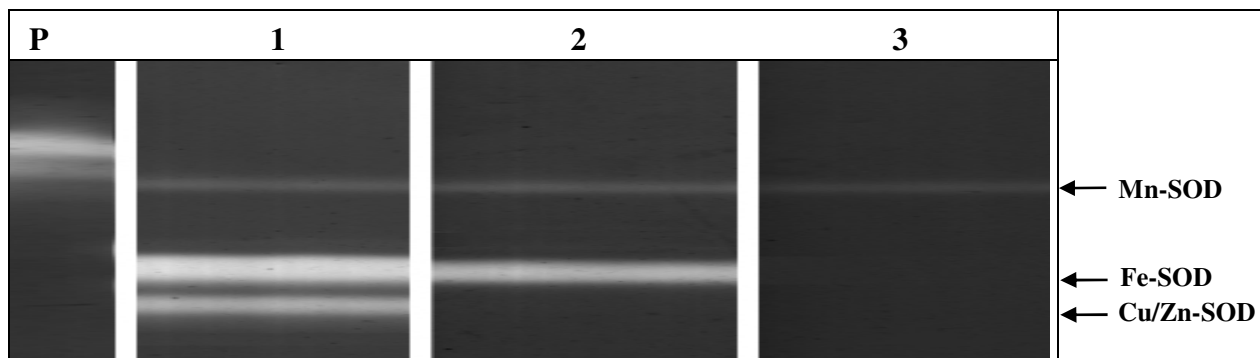


Figura 32 – Determinação das isoformas de SOD em PAGE em fruto. P. Padrão SOD bovino; 1. MT controle 20 dias na condição padrão; 2. MT controle 20 dias com KCN; 3. MT controle 20 dias com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.5.2 Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro

A catalase (CAT) está localizada nos peroxissomos e metaboliza o  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$ . A CAT foi estudada através de sua atividade em espectrofotômetro e o cálculo baseado na quantificação das proteínas totais. As análises da CAT estão apresentadas em forma de gráficos de folha, raiz e fruto.

A atividade da CAT em folha apresentou aumento de atividade aos sete e 36 dias para o MT e aumento de atividade nos três períodos analisados para o *Nr*, quando expostos ao NaCl (Figura 33). Os tratamentos com  $CdCl_2$  apresentaram aumento de atividade para os três períodos analisados, quando comparados aos seus controles (Figura 33). Em raiz, a atividade da CAT nos dois genótipos expostos ao NaCl apresentaram aumento aos 36 dias (Figura 34). A exposição ao  $CdCl_2$  levou ao aumento da atividade da CAT nos dois genótipos e nos três períodos analisados (Figura 34). Em fruto, a atividade de CAT apresentou decréscimo para o *Nr* e o MT tratados com NaCl, e aumento de atividade no *Nr* tratado com  $CdCl_2$  aos 36 dias de exposição se comparado aos seus controles (Figura 35).

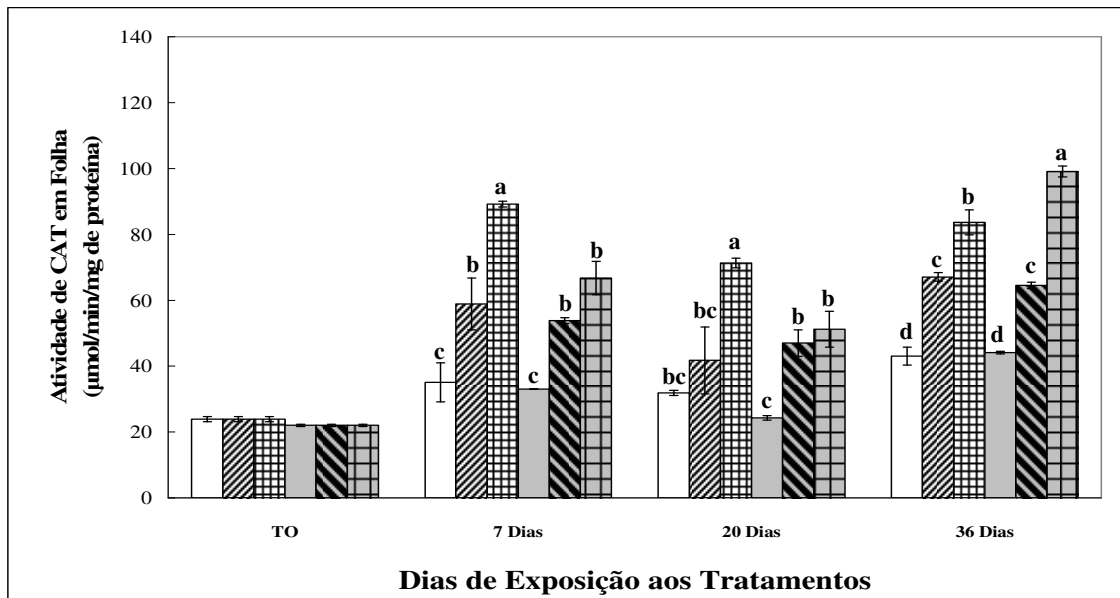


Figura 33 – Atividade específica da catalase em folha de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de  $CdCl_2$  (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▤); *Nr* 0,5 mM de  $CdCl_2$  (▧)

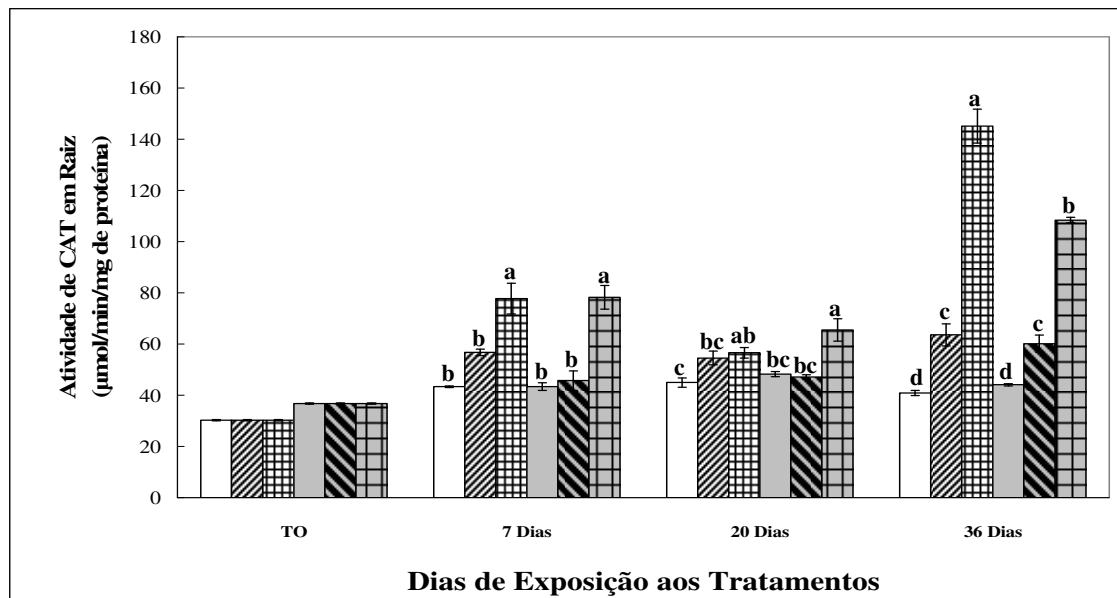


Figura 34 – Atividade específica da catalase em raiz de MT e Nr após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); Nr controle 0 mM (■); Nr 100 mM de NaCl (▧); Nr 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▦)

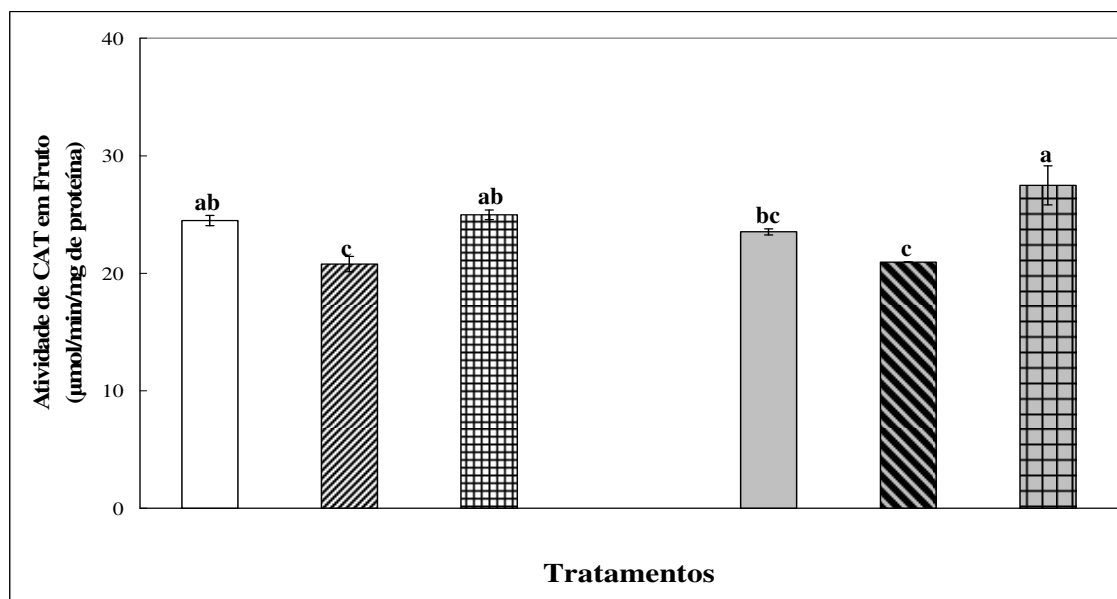


Figura 35 – Atividade específica da catalase em fruto de MT e Nr após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); Nr controle 0 mM (■); Nr 100 mM de NaCl (▧); Nr 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▦)

### 4.5.3 Atividade da glutatona redutase (GR) em espectrofômetro

A glutatona redutase (GR) age de maneira indireta no combate das EAOs, através do ciclo Halliwell-Asada, regenerando a GSH a partir da sua forma oxidada GSSG. É uma enzima importante também no ciclo ascorbato-glutationa. Essa enzima também foi estudada por espectrofômetro, e calculada com base na quantificação das proteínas totais. Os resultados estão apresentados em gráficos de folha, raiz e fruto.

A atividade da enzima GR, em folha e raiz, apresentou aumento de atividade para todos os tratamentos ao longo do desenvolvimento das plantas quando comparados aos seus controles (Figuras 36 e 37). A atividade de GR em fruto não apresentou resultados significativos aos 36 dias de exposição ao NaCl para ambos genótipos e pequeno aumento de atividade no *Nr* tratado com CdCl<sub>2</sub> (Figura 38).

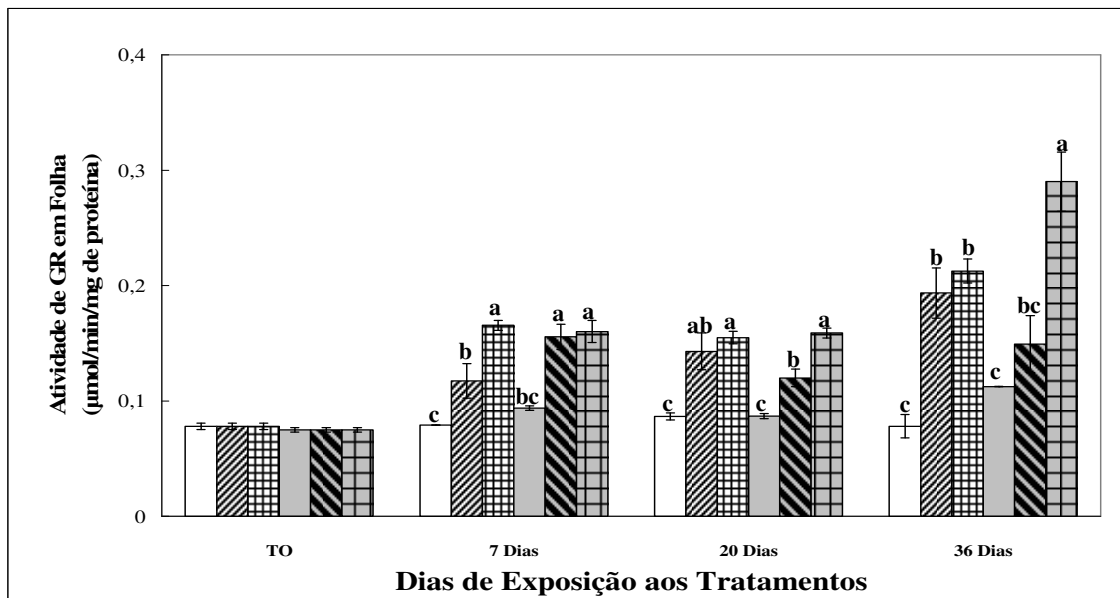


Figura 36 – Atividade específica da glutatona redutase em folha de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▩); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▨)

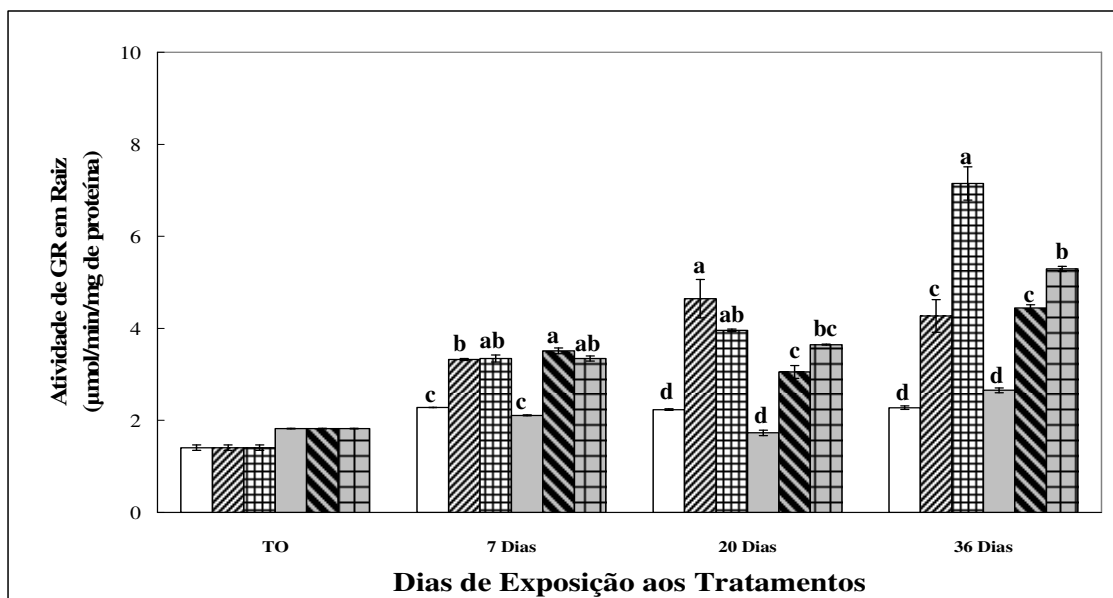


Figura 37 – Atividade específica da glutatona redutase em raiz de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▩); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩)

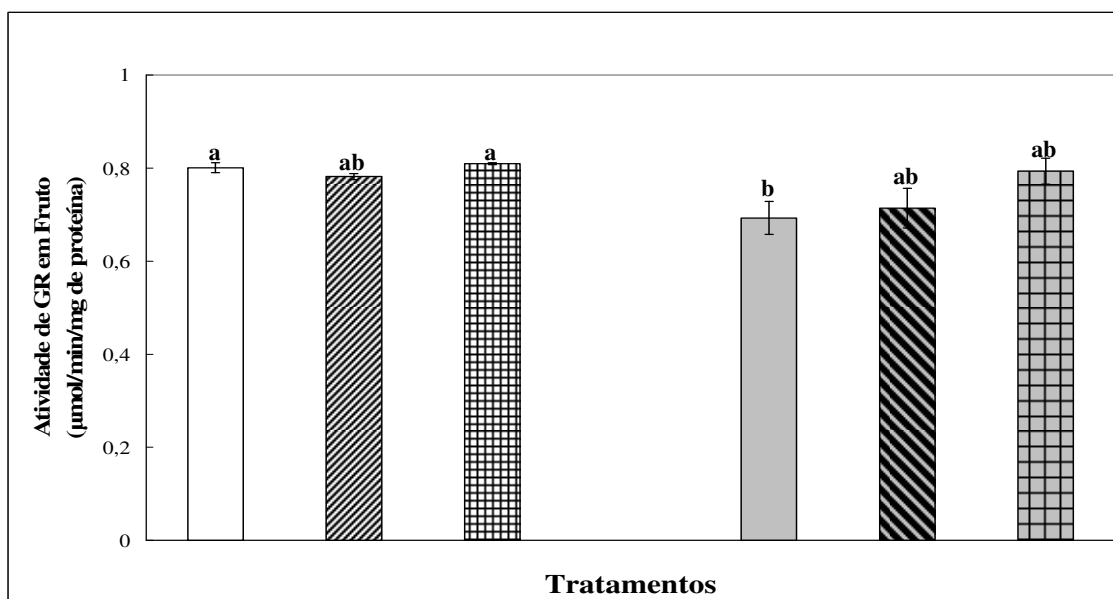


Figura 38 – Atividade específica da glutatona redutase em fruto de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▩); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩)

#### 4.5.4 Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em espectrofotômetro

A enzima ascorbato peroxidase (APX) é um importante catalisador na reação de redução do  $H_2O_2$  a água pela oxidação do ascorbato. As análises realizadas para essa enzima estão apresentadas em forma de gráficos para cada tecido vegetal, e o cálculo da atividade específica foi baseado na quantificação das proteínas totais.

A atividade da APX em folha, aos 20 dias, apresentou diferença significativa para o *Nr* tratado com  $CdCl_2$  (Figura 37). Aos 36 dias de exposição ao  $NaCl$  e ao  $CdCl_2$ , ambos os genótipos apresentaram aumento de atividade quando comparados aos seus controles (Figura 39). A atividade da enzima, em raiz, apresentou aumento de atividade aos sete dias de exposição ao  $NaCl$  e ao  $CdCl_2$  para os dois genótipos. Aos 20 dias, somente o *Nr* tratado com  $NaCl$  apresentou diferença de atividade (Figura 40). Aos 36 dias de exposição, o *MT* tratado com  $CdCl_2$  apresentou decréscimo de atividade quando comparado ao seu controle (Figura 40). Em fruto, a atividade de APX não apresentou diferenças significativas para ambos os genótipos e tratamentos (Figura 41).

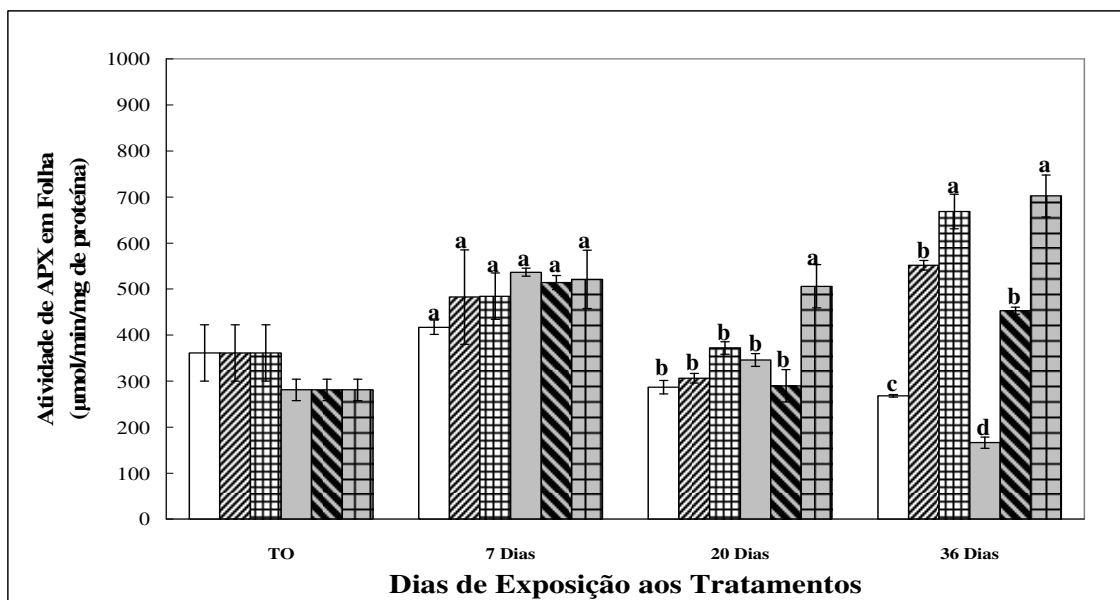


Figura 39 – Atividade específica da ascorbato peroxidase em folha de *MT* e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. *MT* controle 0 mM (□); *MT* 100 mM de  $NaCl$  (▨); *MT* 0,5 mM de  $CdCl_2$  (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de  $NaCl$  (▤); *Nr* 0,5 mM de  $CdCl_2$  (▧)



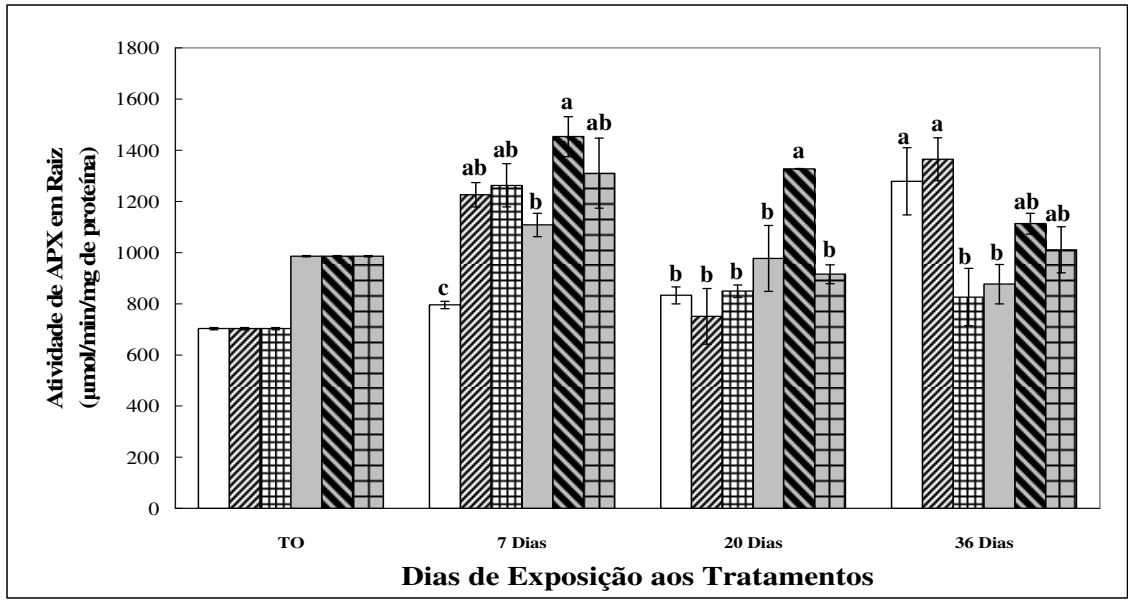


Figura 40 – Atividade específica da ascorbato peroxidase em raiz de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▤); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▧)

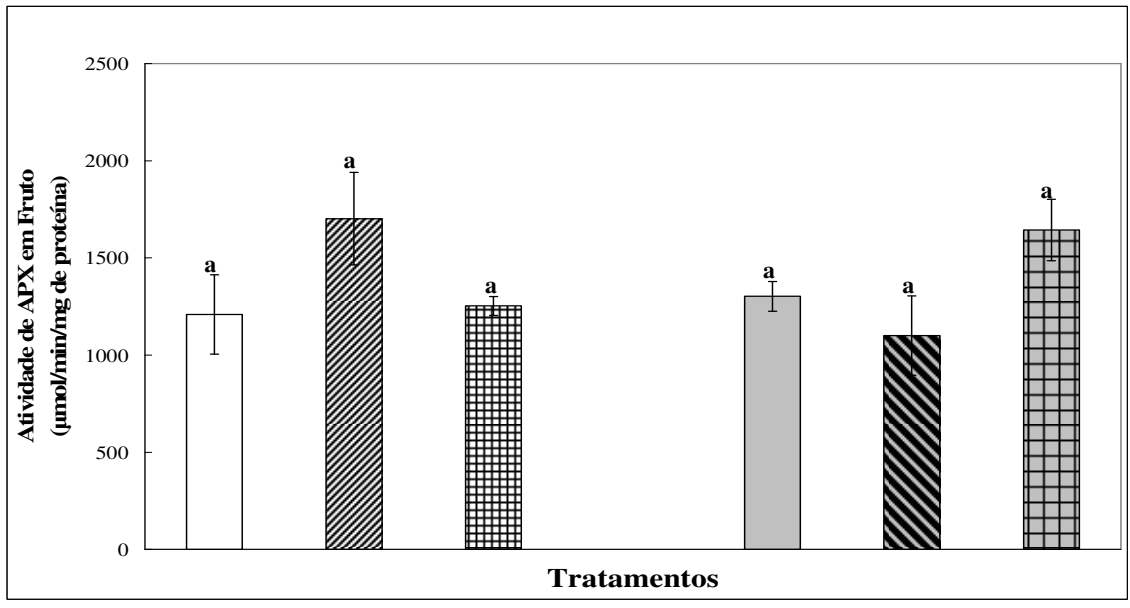


Figura 41 – Atividade específica da ascorbato peroxidase em fruto de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▤); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▧)

#### 4.5.5 Atividade da guaiacol peroxidase (GPOX) em espectrofotômetro

A guaiacol peroxidase (GPOX) age de forma similar a APX, de maneira indireta, catalisando a reação de quebra do  $H_2O_2$  em água e  $O_2$ , através de um agente redutor, neste caso o guaiacol. O cálculo dessa enzima foi baseado na quantificação das proteínas totais, e os resultados apresentados em gráficos distintos para cada tecido vegetal.

Em folha, a atividade da GPOX apresentou aumento de atividade aos sete, 20 e 36 dias para o genótipo *Nr* tratado com NaCl e  $CdCl_2$  (Figura 42). O genótipo MT apresentou maior diferença da atividade da APX aos sete e 20 dias no tratamento com  $CdCl_2$ , e aos 36 dias para ambos os tratamentos (Figura 42). Em raiz, a atividade de APX apresentou diferenças significativas aos sete e 20 dias para ambos os genótipos e tratamentos quando comparados aos seus controles (Figura 43). Em fruto, a maior diferença encontrada na atividade da enzima foi no *Nr* tratado com NaCl (Figura 44).

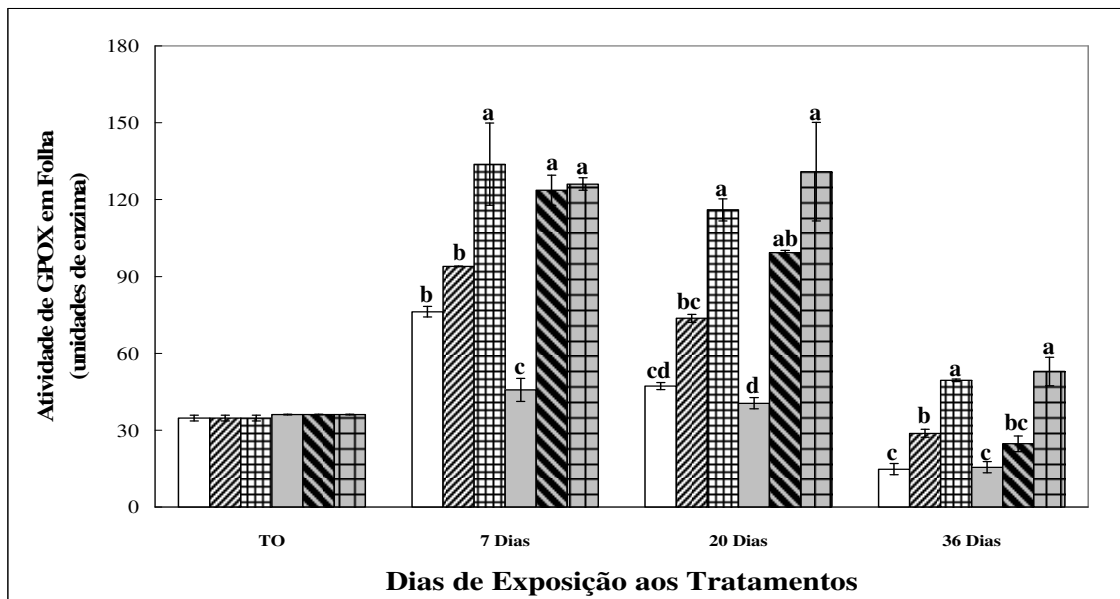


Figura 42 – Atividade específica da guaiacol peroxidase em folha de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de  $CdCl_2$  (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▤); *Nr* 0,5 mM de  $CdCl_2$  (▧)

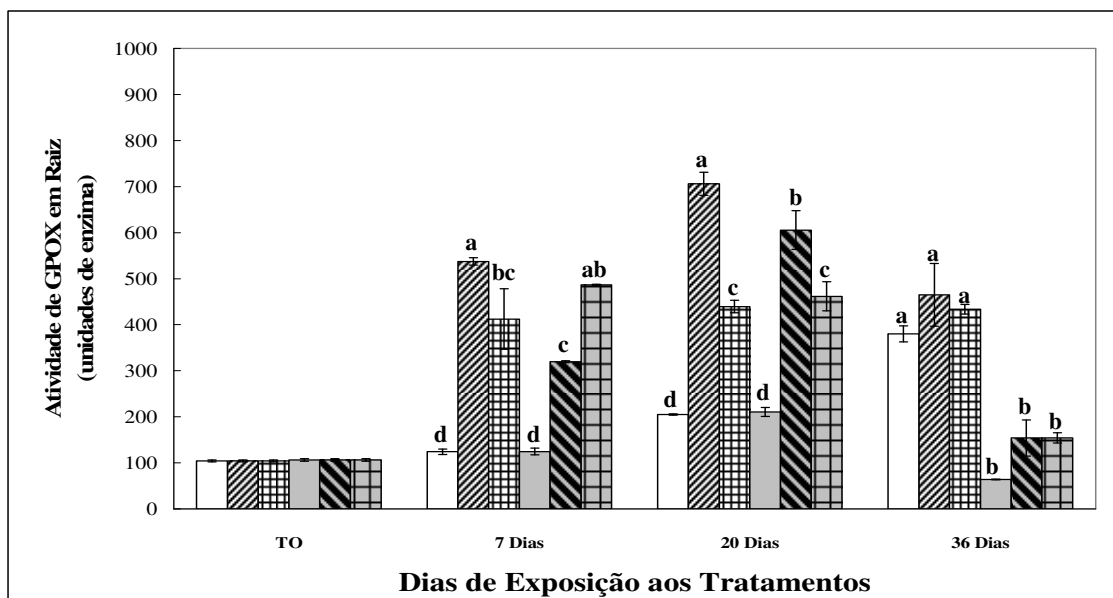


Figura 43 – Atividade específica da guaiacol peroxidase em raiz de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▤); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▧)

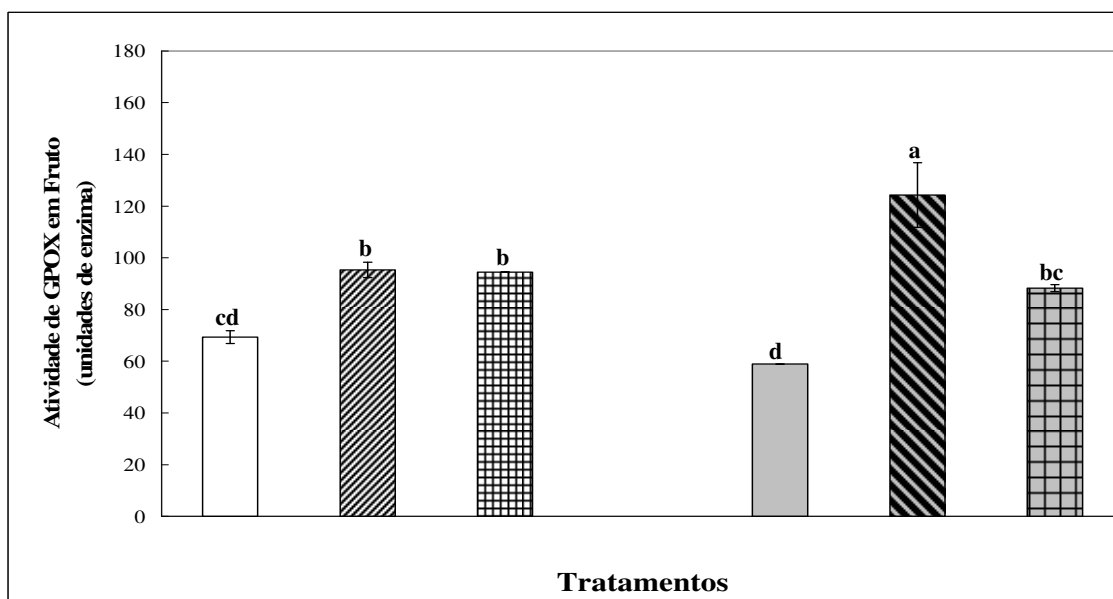


Figura 44 – Atividade específica da guaiacol peroxidase em fruto de MT e *Nr* após sete, 20 e 36 dias de exposição aos tratamentos. MT controle 0 mM (□); MT 100 mM de NaCl (▨); MT 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▩); *Nr* controle 0 mM (■); *Nr* 100 mM de NaCl (▤); *Nr* 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (▧)

#### 4.6 Análise das concentrações de Na e Cd em folhas, raiz e frutos

As determinações de Na e Cd foram realizadas conforme metodologia descrita e estão apresentadas em forma de tabela. A análise dessas concentrações é importante para o conhecimento do acúmulo desses elementos ao longo do desenvolvimento da planta. Para o tratamento com NaCl, nota-se que houve absorção de sódio (Na) também pelos controles. Apesar de essas concentrações terem sido detectadas, são de valores inferiores aos dos tratamentos. Nas análises dos dados observou-se um aumento gradativo de concentração dos elementos estudados (Na e Cd) com o desenvolvimento dos tecidos da planta (folha, raiz e fruto) e sem diferenças significativas entre os genótipos (Tabela 5). Ou seja, para a absorção dos elementos estudados, os dois genótipos atuaram de maneira semelhante.

Tabela 5 - Resultado da quantificação de Na e de Cd em mmol/g de matéria seca em raiz, folha e fruto de tomateiro

| Órgão | Tratamento                            | 7 dias |         | 20 dias |         | 36 dias |         |
|-------|---------------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Raiz  | MT controle 0 mM de NaCl              | 48,66  | ± 2,93  | 70,43   | ± 6,17  | 71,07   | ± 10,16 |
|       | MT 100 mM de NaCl                     | 438,64 | ± 22,18 | 672,36  | ± 50,82 | 640,35  | ± 67,46 |
|       | Nr controle 0 mM de NaCl              | 62,41  | ± 7,70  | 79,40   | ± 19,24 | 110,14  | ± 10,58 |
|       | Nr 100 mM de NaCl                     | 387,41 | ± 111,3 | 710,78  | ± 19,21 | 768,42  | ± 66,54 |
|       | MT controle 0 mM de CdCl <sub>2</sub> | -      | -       | -       | -       | -       | -       |
|       | MT 0,5 mM de CdCl <sub>2</sub>        | 1,40   | ± 0,18  | 8,70    | ± 0,82  | 24,55   | ± 0,88  |
|       | Nr controle 0 mM de CdCl <sub>2</sub> | -      | -       | -       | -       | -       | -       |
|       | Nr 0,5 mM de CdCl <sub>2</sub>        | 3,42   | ± 0,68  | 10,24   | ± 0,42  | 27,22   | ± 2,45  |
| Folha | MT controle 0 mM de NaCl              | 37,78  | ± 1,10  | 46,10   | ± 6,92  | 72,36   | ± 17,43 |
|       | MT 100 mM de NaCl                     | 342,58 | ± 30,87 | 845,26  | ± 57,63 | 1082,19 | ± 48,34 |
|       | Nr controle 0 mM de NaCl              | 37,78  | ± 3,99  | 60,19   | ± 26,98 | 64,03   | ± 25,07 |
|       | Nr 100 mM de NaCl                     | 326,57 | ± 34,63 | 755,61  | ± 79,98 | 979,73  | ± 38,42 |
|       | MT controle 0 mM de CdCl <sub>2</sub> | -      | -       | -       | -       | -       | -       |
|       | MT 0,5 mM de CdCl <sub>2</sub>        | 0,59   | ± 0,02  | 2,13    | ± 0,40  | 4,65    | ± 0,22  |
|       | Nr controle 0 mM de CdCl <sub>2</sub> | -      | -       | -       | -       | -       | -       |
|       | Nr 0,5 mM de CdCl <sub>2</sub>        | 0,63   | ± 0,08  | 2,17    | ± 0,23  | 5,16    | ± 1,03  |
| Fruto | MT controle 0 mM de NaCl              | ...    | ...     | ...     | ...     | 23,69   | ± 9,07  |
|       | MT 100 mM de NaCl                     | ...    | ...     | ...     | ...     | 150,48  | ± 14,54 |
|       | Nr controle 0 mM de NaCl              | ...    | ...     | ...     | ...     | 23,69   | ± 9,85  |
|       | Nr 100 mM de NaCl                     | ...    | ...     | ...     | ...     | 144,71  | ± 9,85  |
|       | MT controle 0 mM de CdCl <sub>2</sub> | ...    | ...     | ...     | ...     | -       | -       |
|       | MT 0,5 mM de CdCl <sub>2</sub>        | ...    | ...     | ...     | ...     | 0,20    | ± 0,06  |
|       | Nr controle 0 mM de CdCl <sub>2</sub> | ...    | ...     | ...     | ...     | -       | -       |
|       | Nr 0,5 mM de CdCl <sub>2</sub>        | ...    | ...     | ...     | ...     | 0,23    | ± 0,00  |

Notas: Dados numéricos arredondados.

Sinais convencionais utilizados:

- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.
- ... Dado numérico não disponível.



## 5 DISCUSSÃO

Muitos trabalhos reportam a existência de um complexo de sinais reguladores que ocorrem em plantas durante estresses abióticos (FRANCIA et al., 2007). As plantas são confrontadas com uma série de estresses aos quais elas são capazes de integrar respostas. Muitos estudos têm mostrado que as respostas celulares destas mudanças ambientais podem explicar porque as plantas resistentes a um estresse são algumas vezes tolerantes a outros estresses (FRANCIA et al., 2007).

Os fitormônios são responsáveis pela integração de muitos aspectos relacionados com o crescimento e desenvolvimento da planta (KLEE, 2004). Estudos mostram que o fitormônio etileno desempenha um importante papel na regulação e modulação das respostas a estresse biótico e abiótico em plantas, o qual conduz a uma especulação que o etileno é o principal regulador das respostas de defesa em plantas (JOHNSON; ECKER, 1998), de maneira a regular a produção de EAOs e a sensibilidade das células a esses sinais.

O etileno é rapidamente difusível tendo um importante papel na integração de eventos relacionados ao desenvolvimento e fatores externos. É um componente crítico de muitos processos como germinação de sementes, amadurecimento de frutos, abscisão e senescência. Alterações na ação do etileno são avaliadas através da engenharia genética de cultivares. A manipulação da biossíntese de etileno ou percepção permite a modulação de processos e criam plantas com traços mais robustos e desejáveis, dando-nos a idéia da importância do etileno na planta (ARORA, 2005). Assim, o uso de mutantes hormonais que estão disruptos nas respostas aos hormônios ou sinais ambientais são frequentemente utilizados para demonstrar ou excluir interações entre vias de sinais de transdução (COENEN; LOMAX, 1998).

### 5.1 Salinidade

O efeito do estresse salino na produção do etileno ainda não está claro. Em plântulas de *Arabidopsis* submetidas a duas concentrações de sal, a produção de etileno aumentou na mesma proporção que aumentou a concentração de NaCl aplicada (HALL; SMITH, 1995). Outros pesquisadores estudaram tomateiro, e à medida que aumentava a concentração de sal na zona radicular, aumentava a produção de etileno nas folhas (FENG; BARKER 1992). Em contraste, a salinidade não provocou aumento da produção de etileno em milho (CRAMER, 1992). Ainda não

está claro se o aumento das taxas de etileno produzido pode ser a consequência do estresse salino ou a indução de um processo de aclimação ao sal em plantas (PETRUZZELLI et al., 2000).

Para entender melhor a relação entre os efeitos do estresse salino e a resposta do etileno frente a esse estresse, o estudo do mutante *Nr* nos pareceu ser um material interessante. A discussão dos resultados segue a ordem do tempo de exposição dos genótipos ao tratamento com 100 mM NaCl em cada tecido. Para melhor visualização dos resultados e acompanhamento da discussão, decidiu-se colocar a numeração das figuras e tabelas após citação de cada resultado. Somente os dados mais relevantes foram discutidos, sempre tentando comparar as respostas fisiológicas e bioquímicas do mutante *Nr* com o genótipo MT expostos ao NaCl. Os tempos sete, 20 e 36 dias mencionados no texto correspondem ao período de exposição ao tratamento com NaCl, e não o tempo de desenvolvimento das plantas.

Pela análise de concentração de Na nos tecidos, observou-se acúmulo desse elemento também nos controles, o que provavelmente provém da água da solução ou de resíduos contidos nos sais utilizados, ou mesmo da areia de rio utilizada. Nos tratamentos, notou-se que o acúmulo desse elemento foi gradativo ao longo do desenvolvimento das plantas, sendo que a raiz, aos sete dias, acumulou mais que a folha (Tabela 5). O mesmo não ocorreu aos 20 e 36 dias, pois os maiores valores de Na obtidos foram em folha (Tabela 5). Tal resultado assemelha-se ao observado em folha de *Atriplex nummularia*, em cujo tecido a concentração de Na foi muito maior que a apresentada em raiz (SILVEIRA et al., 2009). Em espécies de *Atriplex*, o Na é acumulado nos vacúolos e em estruturas especializadas da folha, como nos tricomas e em vesículas, evitando o dano que o íon poderia causar com o contato direto com organelas citosólicas e com biomoléculas (BRADLEY; MORRIS, 1991).

Apesar das plantas apresentarem acúmulo de Na nos três tecidos, somente em folha observou-se redução da massa seca para o MT e para o *Nr* tratados com NaCl (Figura 7). A redução de massa seca em folha aos 20 dias foi de 18% para ambos os genótipos. Já aos 36 dias em folha, a redução foi de 26% para o MT e de 23% para o *Nr*. O acúmulo de Na nos tecidos pode reduzir a assimilação de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), através do desbalanço entre  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , já que o  $\text{K}^+$  está envolvido na absorção e no transporte de  $\text{NO}_3^-$  (CRAMER et al., 1995). Estudos de Debouba et al. (2006) em plântulas de tomateiros (*Solanum lycopersicum* Mill, cultivar Chicli F1) com 10 dias de exposição a 100 mM de NaCl mostraram redução de 70 % na massa seca de folha e de 10% na massa seca de raiz.

A folha do MT tratada com NaCl por sete dias, apresentou maior conteúdo de MDA (Figura 21), bem como aumento da intensidade da Mn-SOD (banda I), isoenzima que é encontrada nas mitocôndrias, e da Fe-SOD (banda II), isoenzima que é encontrada nos cloroplastos (Figura 27 e Tabela 2). Esses resultados sugerem que pode estar ocorrendo estresse no sistema de fotorespiração das células (FOYER; NOCTOR, 2003). Em análise de SDS-PAGE do MT tratado com NaCl (Figura 14), observou-se o aparecimento de um polipeptídeo de aproximadamente 220 kDa, não observado no controle. Um polipeptídeo de massa molecular similar, ou seja, de 220 kDa, o qual foi encontrado em ervilha (*Pisum sativum*), através de cromatografia, é muito semelhante com subunidades de fibronectina de mamíferos (PELLENC et al., 2004), que é uma glicoproteína estrutural envolvida com várias atividades biológicas, entre elas a diferenciação celular (ORNELLAS et al., 2006), o que pode sugerir um caso similar, visto que aos sete dias as plantas estavam em pleno processo de diferenciação celular. Já em folha do mutante *Nr*, aos sete dias de desenvolvimento, apresentou aumento da atividade de GR (Figura 36) e de GPOX (Figura 42), indicando que possivelmente esse sistema antioxidante está atuando para a desintoxicação do  $H_2O_2$  que aumentou em relação ao controle (Figura 24), ou seja, diferentemente do MT que não apresentou tais respostas. Aumento da atividade de GPOX em resposta a salinidade também foi observado tanto em folha como raiz de *Mentha pulegium* (OUESLATI et al., 2009).

Em raízes de MT, aos sete dias de tratamento, observou-se um aumento na concentração de MDA (Figura 22), que pode ter originado aumento na concentração de  $H_2O_2$  (Figura 25). A enzima GPOX (Figura 43) que apresentou aumento de atividade aos sete dias em MT, poderia estar atuando na desintoxicação do  $H_2O_2$  produzido em excesso. O mutante *Nr* apresentou aumento na concentração de  $H_2O_2$  (Figura 25) e na atividade das enzimas GR (Figura 37) e APX (Figura 40). As enzimas GR e APX poderiam estar atuando na remoção do  $H_2O_2$  no *Nr* aos sete dias de forma indireta pelo ciclo da ascorbato-glutationa (GRATÃO et al., 2005). Um composto muito estudado que também poderia estar atuando contra o excesso de  $H_2O_2$  (Figura 25) na raiz de *Nr* poderia ser a glutathione (NOCTOR; FOYER, 1998), devido ao aumento da atividade de GR, tanto em raiz (Figura 37) quanto em folha (Figura 36). Trabalhos futuros devem atentar para este aspecto e muito possivelmente a análise de outros metabólitos e enzimas do ciclo glutathione-ascorbato, particularmente no mutante *Nr*.



Aos 20 dias de tratamento, folha do mutante *Nr* apresentou aumento no conteúdo de MDA (Figura 21) com diferença não significativa em relação ao MT, assim como a atividade das enzimas analisadas em espectrofotômetro. Ambos os genótipos apresentaram aparecimento ou aumento bastante significativo, de uma banda com de aproximadamente 45 kDa em folha (Figura 15). Um polipeptídeo com massa molecular semelhante foi encontrado em trigo submetido a uma dose de 200 mM de NaCl, indicando ser da membrana do tilacóide, ou seja, polipeptídeos correlacionados ao fotossistema II (PSII) do cloroplasto (SULEYMANOV; HUSEYNOVA, 2008). Esse resultado pode confirmar a indução da Cu/Zn-SOD (banda III) (Figura 27 e Tabela 2) observada nesse trabalho, que é uma isoenzima encontrada nos cloroplastos, assim como o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folha de MT (Figura 24). Além disso, observou-se também que uma banda do gel de SDS-PAGE com massa molecular de aproximadamente 220 kDa desapareceu em folha MT aos 20 dias de tratamento (Figura 15). Esse polipeptídeo poderia até ser o mesmo encontrado aos sete dias em folha de MT, correspondente a uma glicoproteína relacionada à diferenciação celular (PELLENC et al., 2004; ORNELLAS et al., 2006). Em raiz de MT com 20 dias de tratamento, o estresse por NaCl também induziu a Cu/Zn-SOD (banda III) (Figura 29 e Tabela 3), aumentando ainda a atividade das enzimas GR (Figura 37) e GPOX (Figura 43), que possivelmente estariam atuando no sistema de defesa da planta contra o aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 25), principalmente nos cloroplastos.

Com 36 dias de exposição ao NaCl, a folha apresentou aumento no conteúdo de MDA (Figura 21) e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 24) e na atividade das enzimas analisadas, com relação aos controles, para ambos genótipos. Ainda aos 36 dias de exposição, em folha foi observado o aparecimento de uma banda de aproximadamente 80 kDa para ambos os genótipos (Figura 16). Com essa massa molecular proteínas conhecidas como *heat shock proteins* (HSPs) foram caracterizadas. As HSPs são proteínas induzidas rapidamente quando ocorre algum tipo de estresse nas células (HE; HUANG, 2007). Novamente, futuros trabalhos mais detalhados utilizando-se 2D-PAGE podem ser empregados para melhor caracterização dessas proteínas, seguido de um eventual seqüenciamento para identificação das mesmas.

Em raiz de MT aos 36 dias de tratamento, observou-se aumento no conteúdo de MDA (Figura 22), assim como aumento da intensidade da isoforma Cu/Zn-SOD (banda III) (Figura 29 e Tabela 3), relacionada com cloroplasto e citosol. A salinidade pode levar ao aumento da peroxidação lipídica (YING et al., 1995), sendo que um dos sintomas mais evidentes de estresse

oxidativo é a peroxidação de lipídeos em membranas biológicas (CHO; SEO 2005). Com 36 dias de exposição ao NaCl, a atividade da enzima APX (Figura 40) mostrou-se mais elevada no MT, quando comparada ao *Nr* já na condição controle, ou seja, sugerindo que muito provavelmente esta enzima na raiz poderia melhor predispor o MT a uma resposta mais imediata a algum estresse oxidativo do que o *Nr*, pelo menos para este estágio de desenvolvimento das plantas.

Em fruto de MT e *Nr* notou-se aumento da peroxidação lipídica (Figura 23), assim como aumento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 26). Para a remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso na célula, a enzima que apresentou aumento na atividade foi a GPOX (Figura 44). Além da GPOX, outras enzimas existentes relacionadas a respostas antioxidativas, as quais não foram analisadas nesse trabalho, podem estar atuando na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que possa ter escapado da ação da GPOX, seja por excesso do metabólito ou pela incapacidade celular de geração de GPOX e sua respectiva ação na desintoxicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por exemplo, a monodehidroascorbato redutase (MDHAR) localizada também nos peroxissomos e mitocôndrias (DEL RIO et al., 2002), ou mesmo a glutathiona peroxidase (GPX) localizada no citosol, cloroplasto, mitocôndria e retículo endoplasmático (MILLAR et al., 2003), podem estar tendo papel ativo e prioritário nesse tecido e nessas condições.

Em relação mais especificamente aos tecidos da planta, em folha observou-se uma resposta mais imediata para o genótipo MT ao estresse, como observado pelo aumento do conteúdo de MDA (Figura 21), claro indicativo de uma situação de estresse instalada, e indução de um novo polipeptídeo aos sete dias (Figura 14), aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aos 20 dias (Figura 24), ou seja, também indicativo de estresse pelo aumento dessa EAO e incapacidade celular de, nesse momento e nessas condições, de responder a geração excessiva dessa EAO. Sob condições de estresse por NaCl, Ying et al. (2004) verificaram que há diferença na expressão dos genes relacionados aos receptores de etileno em seedlings de tomate. A expressão do gene *LeETR1* é promovida após 12 horas de tratamento com diferentes concentrações de NaCl, enquanto que a expressão dos genes *LeETR2* e *LeETR3* aumentam com mais de 12 horas de exposição ao NaCl. Geralmente, as plantas respondem rápido ao aumento dos níveis de hormônio na tentativa de reduzir os efeitos em múltiplos caminhos. Os mecanismos para manter a homeostase na célula podem incluir a conjugação, degradação, sequestro e alteração da sensibilidade aos hormônios (TIEMAN et al., 2000). Além disso, as respostas ao estresse salino não estão relacionadas somente com o hormônio etileno. Um hormônio que apresenta interação

com o etileno é o ácido abscísico (ABA), como observado em mutantes de tomateiro deficientes em ABA que super produzem etileno (TAL et al., 1979). O ABA também pode induzir o acúmulo de prolina (OBER; SHARP, 1994), que é um aminoácido que pode estar envolvido no processo de retenção de água na célula, proteção e estabilização de macromoléculas e estruturas celulares (BOHNERT; JENSEN, 1996). Estudos de El-Khallal et al. (2009) mencionam que o estresse por NaCl pode levar a um desbalanço hormonal que está associado com o acúmulo de ABA e decréscimo dos níveis de ácido indol-ácetico (AIA), giberilina (GA3) e citocininas. Finalmente, o ABA pode induzir ao acúmulo de proteínas LEA, que são consideradas osmoprotetoras (THOMAS; BOHNERT, 1993). Apesar desses aspectos serem importantes e merecerem futura investigação, o que faz parte da continuidade desse trabalho, para esta pesquisa procuramos focar e centralizar mais na resposta antioxidante e na comparação entre dois agentes estressores e dois genótipos distintos. Ainda, mais especificamente no caso da prolina, seria interessante investigar se ocorreu acúmulo nas plantas submetidas ao NaCl já que seu aumento em resposta a estresse salino e hídrico é bem conhecido e muito provavelmente deve ter ocorrido em nossas plantas.

## 5.2 Cádmio

Alguns metais como o Cd interferem na síntese de etileno, estimulando a atividade da ACC sintase, enzima chave para a biossíntese desse hormônio. Este aumento na atividade enzimática está associado com o efeito indireto através de sinais de células adjacentes que são diretamente afetadas pelo Cd (FUHRER, 1982). Entretanto, este contato direto entre o Cd e a proteína da ACC sintase *in vitro* resulta na inibição da atividade enzimática (FUHRER, 1982). A literatura mostra que um aumento na produção do etileno ocorreu em folhas de feijão expostas ao Cd (FUHRER, 1982) e em raiz de ervilha tratadas com Cd (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2006). Além disso, Iakimova et al. (2008) relataram que o aumento da produção de etileno em células de tomate tratadas com Cd coincidiu com o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantificado nas células, o que sugere que o etileno pode agir através da estimulação da produção de EAOs em plantas estressadas.

Em plantas, os sintomas gerais dos processos fisiológicos e metabólicos influenciados pelas concentrações em níveis tóxicos de Cd são: inibição do crescimento radicular e da parte

aérea (BOUSSAMA et al., 1999), senescência acelerada nas folhas (SIEDLECKA; KRUPA, 1999), alterações no metabolismo de nitrogênio em diversas espécies de plantas (BALESTRASSE et al., 2006), redução do vigor e interferência no processo de fotossíntese (PRASAD, 1997) devido à alteração nas funções dos estômatos, no transporte de elétrons, no ciclo de Calvin, desordens na estrutura dos grana e na síntese de clorofila (SIEDLECKA; KRUPA, 1999).

Como mencionado para o estresse com NaCl, a discussão dos resultados para Cd segue a ordem do tempo de exposição dos genótipos ao tratamento com 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> em cada tecido. Para melhor visualização dos resultados, decidiu-se colocar a numeração das figuras e tabelas após citação do resultado. Somente os dados mais relevantes foram discutidos, sempre tentando comparar as respostas fisiológicas e bioquímicas do mutante *Nr* com o genótipo MT expostos ao CdCl<sub>2</sub>. Os tempos sete, 20 e 36 dias mencionados no texto correspondem ao período de exposição ao tratamento com NaCl e não o tempo de desenvolvimento das plantas.

A análise da distribuição e acúmulo de Cd nas plantas revelou que o metal acumulou em maior concentração na raiz, seguida da folha e fruto (Tabela 5). A distribuição do metal nas plantas ocorre de forma generalizada, porém o primeiro sistema a acumular os metais normalmente tem sido o radicular (MEDIOUNI et al., 2006; GRATÃO et al., 2005). Fatores como estágio de crescimento e tempo de exposição ao metal, também afetam a absorção e distribuição de Cd entre diferentes partes da planta (FOJTOVÁ et al., 2002; SCHÜTZENDUBEL; POLLE, 2002), como também o sistema de cultivo utilizado. Apesar das plantas apresentarem acúmulo de Cd nos três tecidos, apenas em folha aos 20 e 36 dias observou-se diminuição da massa seca para o MT e para o *Nr* tratados (Figura 7). A massa seca em folha de MT apresentou redução de 13,5% aos 20 dias e 22 % aos 36 dias (Figura 7). Já o *Nr* apresentou redução em massa seca de folha de 17% aos 20 dias e de 18,5% aos 36 dias (Figura 7).

Para folha do genótipo MT com sete dias de tratamento, notou-se um maior aumento no conteúdo de MDA (Figura 21) e nas atividades das isoenzimas de SOD, mais significativamente na Mn-SOD (banda I) (Figura 27 e Tabela 2) e atividade da CAT (Figura 33). Já em raiz, o MT tratado com Cd apresentou aumento no conteúdo de MDA (Figura 22) e redução de atividade de forma intensa da isoenzima Cu/Zn-SOD (banda III) (Figura 29 e Tabela 3). Pelos resultados obtidos para MT, nota-se que ocorreram danos nas membranas em folha e raiz, assim como diminuição da atividade da SOD em cloroplasto ou no citosol. O mutante *Nr* também apresentou

respostas ao estresse por Cd, tais como aumento do conteúdo de MDA e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém os resultados foram menos expressivos que em MT, ou seja, aparentemente o estresse pelo Cd foi mais forte em período curto de tempo de exposição em MT do que em *Nr*, quando considerados apenas os indicadores diretos de estresse celular, MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Com 20 dias de exposição ao Cd, os danos provocados foram mais severos do que aqueles apresentados no início dos tratamentos. Em folha, o MT apresentou aumento de maior intensidade da isoenzima Cu/Zn-SOD (banda III) (Figura 27 e Tabela 2), ao contrário do ocorrido para o *Nr*, que apresentou decréscimo geral de atividade de SOD, principalmente pela redução de atividade da isoenzima Cu/Zn-SOD (banda III) (Figura 27 e Tabela 2), indicando possivelmente vias de ação distintas entre os dois genótipos em se tratando da resposta a possível aumento na geração do radical superóxido. A atividade de CAT (Figura 33) em folha apresentou maior aumento no genótipo MT, que pode estar relacionado ao aumento de intensidade da Cu/Zn-SOD, também encontrado em citosol, assim como aparecimento da banda de aproximadamente 45 kDa (Figura 15), aparentemente a mesma que apareceu para os tratamentos com NaCl, referente a peptídeos correlacionados ao fotossistema II (PSII) (SULEYMANOV; HUSEYNOVA, 2008). Contudo, as *heat shock proteins* (HSPs) também se enquadram nesta mesma massa molecular (HE; HUANG, 2007). Estudos de He e Huang (2007) observaram a indução de várias HSPs em Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.) submetidas a estresse por temperatura, sendo algumas de citoplasma (64, 78 e 85 kDa) e de membranas (39, 45 e 66 kDa). Ainda em folha tratada com CdCl<sub>2</sub> aos 20 dias, para o genótipo MT observou-se a repressão de uma banda de aproximadamente 220 kDa (Figura 15), como no MT tratado com NaCl aos 20 dias. Esse polipeptídeo de 220 kDa poderia estar relacionado com a diferenciação celular (PELLENC et al., 2004). Assim como já anteriormente discutido para NaCl, as análises para variações em proteínas feitas por SDS-PAGE devem, e serão, ampliadas com o uso de 2D-PAGE para melhor caracterizar e possivelmente seqüenciar e identificar essas proteínas e outras que apresentaram e apresentem as variações mais significativas para as condições de estresse e em entre os tratamentos e genótipos.

Para a raiz aos 20 dias de tratamento com o metal, pode-se observar aumento significativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 25) para os dois genótipos, seguido de forte redução da atividade da isoenzima Cu/Zn-SOD (banda III) (Figura 29 e Tabela 3). O aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontrado na raiz aos 20 dias poderia estar relacionado com a sinalização celular (APEL, HIRT, 2004; LALOI et al.,

2004) dos danos causados pelo estresse por Cd nas células, visto ainda que o metal acumulou ainda mais com o tempo de exposição (Tabela 5).

O Cd, em contraste com outros metais pesados, não parece agir diretamente na produção de EAOs, via Fenton e/ou reações Haber Weiss (SANITÁ DI TOPPI; GABRIELLI, 1999). Os tratamentos com Cd aos 36 dias foram os mais danosos para as plantas do MT que para plantas *Nr*, como redução de massa seca de folha (Figura 7), aumento no conteúdo de MDA (Figura 21) e na quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 24), assim como diminuição dos teores de clorofila medidos por SPAD (Figura 10). Curiosamente, o Cd sempre mostrou maiores acúmulos em *Nr* do que em MT, não só com 20 dias de exposição, mas durante todo o período analisado. Apesar dos aumentos de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a atividade das enzimas CAT (Figura 33) e GR (Figura 36) foram maiores na folha do *Nr*, indicando que a alteração na resposta por estas enzimas no mutante foi mais eficiente que para o MT. A CAT estaria atuando em combate ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado devido ao estresse gerado pelo Cd nas células, bem como a enzima GR, que participa da redução da glutathiona (GSH) (CREISSEN et al., 1994). A GSH tem uma afinidade alta para ligação ao Cd fazendo deste composto um quelante potencial no citosol (fitoquelatinas – PCs) (BECK et al., 2003). Em arroz, o efeito positivo da ação da GSH foi verificado mediante a síntese de PCs (peptídeos ricos em cisteína) o que conduziu a uma redução do nível de Cd livre nas raízes desta planta (CHEN; KAO, 1995). Segundo Zhu et al. (1999), a alta concentração de GSH em raízes de plantas tem contribuído para aumentar a tolerância ao Cd. Apesar de não termos determinado ou analisado PCs nesse estudo, é provável que tenha ocorrido aumento em PCs visto o acúmulo de Cd em raízes e o aumento de atividade de GR e muito provavelmente de GSH.

Outro efeito observado nos dois genótipos submetidos ao CdCl<sub>2</sub>, aos 36 dias em folha, foi a repressão de duas bandas no gel de SDS-PAGE, uma de aproximadamente 200 kDa (Figura 16) e outra de aproximadamente 60 kDa (Figura 16). O polipeptídeo com massa de aproximadamente 200 kDa poderia ser da família gênica *wcs120*, que são proteínas relacionadas com aclimatação em cereais (SARHAN et al., 1997; VAZQUEZ-TELLO, 1998), bem como da família das proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*), que são proteínas relacionadas a estresse hídrico e estresse por altas temperaturas (ALLAGULOVA, et al., 2003). Em *Arabidopsis thaliana*, o etileno pode modular o ABA, induzindo o fechamento estomático (TANAKA et al., 2005). O Cd também pode regular a disponibilidade de água nas folhas e apresentar regulação osmótica (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002), podendo por consequência gerar o estresse hídrico. O

polipeptídeo com aproximadamente 60 kDa poderia ser uma HSP, pois essa família de proteínas já muito estudada tem massas moleculares variáveis dependendo da organela onde se encontra (HE; HUANG, 2007). No tratamento com Cd também observou o aparecimento da banda de aproximadamente 80 kDa nos dois genótipos (Figura 16), provavelmente a mesma proteína que apareceu nos tratamentos com NaCl aos 36 dias, com potencial de ser uma *heat shock proteins* (HSPs) (HE; HUANG, 2007).

Em raiz aos 36 dias, observou-se o quase desaparecimento da isoenzima Cu/Zn-SOD (banda III) (Figura 29 e Tabela 3), tanto para MT como para *Nr*, o que comprova que com o aumento do tempo de estresse pelo Cd esta isoenzima foi a mais afetada em raiz, tendo um padrão bem identificável de redução de atividade crescente com o estresse pelo Cd, porém, não restrito a um ou outro genótipo. Observou-se ainda um aumento do conteúdo de MDA (Figura 22) nos dois genótipos tratados com CdCl<sub>2</sub>. Porém, a atividade da CAT (Figura 34) e da GR (Figura 37) foi maior em MT do que em *Nr* quando na presença do metal. Pelo aumento de atividade das enzimas antioxidantes relacionadas com desintoxicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como apresentado em raiz, o sistema está trabalhando para manter a homeostase na célula principalmente nesse órgão, no qual o acúmulo do metal foi maior e cumulativo. Porém, pelo decréscimo de certa forma geral da atividade total (somatória das atividades das isoenzimas) de SOD, particularmente da isoenzima Cu/Zn-SOD (banda III) que está relacionada com cloroplasto, peroxissomos e citosol, fica claro que apesar do estresse indiretamente gerar o radical superóxido, que é dismutado pela SOD gerando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a resposta desse grupo de isoenzimas sugere que com o tempo de exposição ao metal, a geração de superóxido possa até estar sendo diminuída. Entretanto, pela diminuição da geração de superóxido e redução da atividade de SOD, o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que está sendo gerado ao longo do tempo levando ao aumento de outras enzimas catabolizadoras deva ter outra origem na célula. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é também um produto da β-oxidação associada ao glioxissomo de ácidos graxos e nas reações de fotorrespiração (SCANDALIOS, 1993; IGAMBERDIEV; LEA, 2002), assim como é produzido nos peroxissomos, principalmente em plantas C3, como o tomateiro, em virtude da reação da glicolato oxidase (FOYER; NOCTOR, 2003).

Em fruto de *Nr* tratado com CdCl<sub>2</sub>, as respostas mais evidentes foram o aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 26) e aumento da intensidade da Mn-SOD (banda I) (Figura 31 e Tabela 4), relacionada com as mitocôndrias e peroxissomos (DEL RÍO et al., 2003), resultado o

qual é o oposto do observado para o mesmo tratamento mas para o genótipo MT, que mostrou redução de atividade (Figura 31 e Tabela 4). Em MT, de forma geral não foram observados aumentos mais expressivos na atividade das enzimas antioxidantes nesse tecido. No fruto podem estar atuando outros compostos não enzimáticos que protegem as células contra estresse oxidativo, como os licopenos e beta-carotenos, vitamina E, entre outros (ROSATI et al., 2000; GRATÃO et al., 2005), que muito provavelmente possam ter papel até maior na proteção celular nesse órgão especificamente.

O MT foi o genótipo que mais apresentou alterações no metabolismo medido através das enzimas antioxidantes e de compostos como o MDA para folha e raiz submetidos ao Cd ao longo de todo o desenvolvimento. O etileno poderia estar envolvido com essas respostas, pois está relacionado a importantes processos fisiológicos na planta, com importante papel na transdução de sinais associados com estresses bióticos e abióticos (BLEECKER; KENDE, 2000; VAN LOON et al., 2006), como também pode estar associado a outros hormônios como auxina, citocinina, ABA, ácido salicílico e jasmonato (GUO; ECKER, 2004; ETHERIDGE et al., 2006). O etileno pode estar ainda relacionado com a elevação do cálcio ( $\text{Ca}^+$ ) através da ativação dos canais permeáveis de  $\text{Ca}^+$  na membrana plasmática da célula guarda (ZHAO et al., 2007). Em plantas, o  $\text{Ca}^+$  atua como um mensageiro secundário durante a sinalização de estresse abiótico (KNIGHT, 2000), além disso é a molécula principal na sinalização do desenvolvimento da planta, podendo regular hormônios. A sinalização do  $\text{Ca}^+$  aos estresses abióticos é dependente do tipo de estresse (KIEGLE et al., 2000), da fase de desenvolvimento da planta (PLIETH et al., 1999) e do tipo de tecido (KIEGLE et al., 2000). Além disso, o etileno pode estimular o influxo de Cd através dos canais permeáveis de  $\text{Ca}^+$  da membrana plasmática (YAKIMOVA et al., 2006).





## 6 CONCLUSÕES

- As plantas tratadas com  $\text{CdCl}_2$  apresentaram danos mais severos que as plantas tratadas com  $\text{NaCl}$ , em relação aos controles;
- O genótipo *Nr* apresenta respostas diferenciadas para os sistemas enzimáticos estudados para cada estresse ao qual foi submetido;
- O genótipo MT apresentou maior sensibilidade aos estresses que o *Nr*;
- A enzima antioxidante GR foi a mais atuante na resposta aos estresses nos dois genótipos submetidos ao  $\text{CdCl}_2$  e ao  $\text{NaCl}$ .



## REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, London, v. 24, p. 1337-1344, 2001.

AL-KARAKI, G.N. Growth, water use efficiency, and sodium and potassium acquisition by tomato cultivars grown under salt stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 23, p. 1-8, 2000.

ALLAGULOVA, C.R.; GIMALOV, F.R.; SHAKIROVA, F.M.; VAKHITOV, V.A. The plant dehydrins: structure and putative functions. **Biochemistry**, Washington, v. 68, p. 945-951, 2003.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 2, p. 224-233, 1997.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Oxford, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.

ARORA, A. Ethylene receptors and molecular mechanism of ethylene sensitivity in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 89, p. 1348-1361, 2005.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 235-241, 1992.

ASADA, K. the water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASHRAF, M.; BASHIR, A. Salt stress induced changes in some organic metabolites and ionic relations in nodules and other plant parts of two crop legumes differing in salt tolerance. **Flora**, New York, v. 198, p. 486–498, 2003.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes too transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigationn, in the leaves and roots of wild-tipe and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

BACCOUCH, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. **Plant Physiology and Biochemistry**, London, v. 36, p. 689-694, 1998.

BAGNOLI, F.; DANTI, S.; MAGHERINI, V.; COZZA, R.; INNOCENTI, A.M.; RACCHI, M.L. Molecular cloning, characterization and expression of two catalase genes from peach. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, p. 349-357, 2004.

BALBI, V.; LOMAX, T.L. Regulation of early tomato fruit development by the *Diageotropica* gene. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 186-197, 2003.

BALESTRASSE, K.B.; GALLEGGO, S.M.; TOMARO, M.L. Oxidation of the enzymes involved in nitrogen assimilation plays an important role in the cadmium-induced toxicity in soybean plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 284, p.187-194, 2006.

BARONDEAU, D.P., KASSMANN, C.J., BRUNS, C.K., TAINER, J.A., GETZOFF, E.D. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. **Biochemistry**, Washington, v. 43, p. 8038-8047, 2004.

BARRY, C.S.; GIOVANNONI, J.J. Ethylene and fruit ripening. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 26, p. 143-159, 2007.

BECK, A.; LENDZIAN, K.; OVEN, M.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, p. 423-431, 2003.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 89, p. 1113-1121, 2005.

- BLEECKER, A.B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plant. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, p. 1-18, 2000.
- BOHNERT, H.J.; JENSEN, R.G. Strategies for engineering waterstress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 14, p. 89–97, 1996.
- BOUSSAMA, N; OUARITI, O; SUZUKI, A; GHORBAL, M.H. Cd-stress on nitrogen assimilation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, p. 310-317, 1999.
- BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, California, v. 43, p. 83-116, 1992.
- BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 13, p. 199-218, 1994.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-259, 1976.
- BRADLEY, P.M.; MORRIS, J.T. Relative importance of ion exclusion, secretion and accumulation in *Spartina alterniflora* Loisel. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 1525-1532, 1991.
- CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function, In: EVERSE, J.; K.E.; GRISHAM, M.B. (Ed.). **Peroxidases in chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. v. 2, p. 25-50.
- CARILLO, P.; MASTROLONARDO, G.; NACCA, F.; FUGGI, A. Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, p. 209–219, 2005.
- CHEN, G.X.; SANO, S.; ASADA, K. The amino acid sequence of ascorbate peroxidase from tea has high degree of homology to that of cytochrome c peroxidase from yeast. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 33, p. 117-123, 1992.

CHEN, H.Y.; LIU, W.Y. The molecular evolution of superoxide dismutase based on its distribution and structure. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, Beijing, v.23, p.408-413, 1996.

CHEN, S.L.; KAO, C.H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedling root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 16, p. 249-252, 1995.

CHO, U.H.; SEO, N.H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, Amsterdam, v. 168, p. 113-120, 2005.

CLELAND, R.E. Auxin and cell elongation, In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 214-225.

COENEN, C.; LOMAX, T.L. The diageotropica gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, p. 63-72, 1998.

CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; LEIDI, E.O.; HERNANDEZ, J.A.; SEVILLA, F.; DELRIO, L.A. Subcellular distribution of superoxide dismutase in leaves of ureide-producing leguminous plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 82, p. 285-291, 1991.

CRAMER, M.D.; SCHIERHOLT, A.; WANG, Y.Z.; LIPS, S.H. The influence of salinity and the utilization of root anaplerotic carbon and nitrogen metabolism in tomato seedlings. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 1569-1577, 1995.

CREISSEN, G.P.; MULLINEAUX, P.M. Cloning and characterisation of glutathione reductase cDNAs and identification of two genes encoding the tobacco enzyme. **Planta**, Bonn, v. 197, p. 422-425, 1995.

CREISSEN, G.P.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.M. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 343-364.

CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. The chemical behaviour of heavy metals plays a prominent role in the induction of oxidative stress. **Free Radical Research**, London, v. 31, p. S39-S43, 1999.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, London, v. 98, p. 29-36, 1997.

DEBOUBA, M.; GOUIA, H.; SUZUKI, A.; GHORBEL, M.H. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato *Lycopersicon esculentum* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, p. 1247-1258, 2006.

DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M.; ALTOMARE, D.A.; ZILINSKAS, B.A. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 923-933, 2003.

DEL RIO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1255-1272, 2002.

DEMIRAL, T.; TURKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 247-257, 2005.

DEWIR, Y.H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M.B.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 93-99, 2006.

DJEBALI, W.; ZARROUK, M.; BROUQUISSE, R.; EL KAHOU, S.; LIMAM, F.; GHORBEL, M.H.; CHAIBI, W. Ultrastructure and lipid alterations induced by cadmium in tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplast membranes. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 358-368, 2005.

EDWARDS, E.A.; RAWSTHORNE, S.; MULLINEAUX, P.M. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). **Planta**, Bonn, v. 180, p. 278-284, 1990.

EL-KHALLAL, S.M.; HATHOUT, T.A.; AHSOUR, A.E.R.A.; KERRIT, A.A. Brassinolide and salicylic acid induced antioxidant enzymes, hormonal balance and protein profile of maize plants grown under salt stress. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Jordan, v. 5, p. 391-402, 2009.



- EMBERSON, L. Air pollution on crops and forests: an introduction. In: EMBERSON, L.; ASHMORE, M.; MURRAY, F. (Ed.). **Air pollutions on crops and forests, a global assessment**. Singapore: Imperial College Press, 2003. p. 3-34.
- EMMANUEL, E.; LEVY, A.A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 112-117, 2002.
- ETHERIDGE, N.; HALL, B.P.; SCHALLER, G.E. Progress report: ethylene signaling and responses. **Planta**, Bonn, v. 233, p. 387-391, 2006.
- FADZILLAH, N.M.; GILL, V.; FINCH, R.P.; BURDON, R.H. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. **Planta**, Bonn, v. 199, p. 552-556, 1996.
- FENG, J.; BARKER, A.V. Ethylene evolution and ammonium accumulation by tomato plants under water and salinity stresses. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 15, n. 11, p. 2471–2490, 1992.
- FIELDES, M.A.; GERHARDT, K.E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. **Plant Science**, Amsterdam, v. 132, p. 89–99, 1998.
- FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 307–319, 2004.
- FOJTOVÁ, M.; FULNECKOVA, J.; FAJKUS, J., KOVARIK, A. Recovery of tobacco cells from cadmium stress is accompanied by DNA repair and increased telomerase activity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 2151-2158, 2002.
- FOYER, C.H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, Bonn, v. 133, p. 21–25, 1976.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 119, p. 355-364, 2003.

FRANCIA, D.; DAMARIA, D.; CALDERINI, O.; FERRARIS, L.; VALENTINO, D.; ARCIONI, S.; TAMIETTI, G.; CARDINALE, F. Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection. **Plant, Cell and Environment**, London, v. 30, p. 1357-1365, 2007.

FRUGOLI, J.A.; ZHONG, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; MCCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

FUHRER, J. Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 70, p. 162-167, 1982.

GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effects of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidences for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, Amsterdam, v. 121, p. 151-159, 1996.

GALLI, U; SCHÜEPP, H; BRUNOLD, C. Thiols in cadmium- and copper-treated maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Bonn, v. 198, p. 139-143, 1996.

GECHEV, T.S., VAN BREUSEGEM, F., STONE, J.M., DENEV, I., LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, Hoboken, v. 28, p. 1091-1101, 2006.

GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKEY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **Plant Journal**, Oxford, v. 13, p. 591-602, 1998.

GOLDBERG, R.; IMBERTY, A.; LIEBERMAN, M.; PRAT, R. Relationships between peroxidative activities and cell wall plasticity. In: GREEPIN, H.; PENEL, C.; GASPER JR., T. (Ed.). **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneva: University of Geneva, 1986. p. 208-220.

GOMES-JUNIOR, R.A.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, Nov. 2006.

GOMES-JUNIOR, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 34, p. 449-456, 2007.

GRANT, J.J.; LOAKE, G.J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 21–29, 2000.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, p. 481-494, 2005.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 153, p. 321-333, 2008.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; PERES, L.E.P.; MEDICI, L.O.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 67, p. 387-394, 2009.

GRAY, W.M. Hormonal regulation of plant growth and development. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 2, e311, 2004.

GREENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. In: SOMERVILLE, C.R.; MEYEROWITZ, E.M. (Ed.). **The Arabidopsis book**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2002. p. 1-20.

GUETA-DAHAN, Y.; YANIV, Z.; ZILINSKAS, B.A.; BEN-HAYYIM, G. Salt and oxidative stress: Similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. **Planta**, Bonn, v. 203, p. 460–469, 1997.

GUO, W.X.; PYE, Q.N.; WILLIAMSON, K.S.; STEWART, C.A.; HENSLEY, K.L.; KOTAKE, Y.; FLOYD, R.A.; BROYLES, R.H. Reactive oxygen species in choline deficiency-induced apoptosis in rat hepatocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, p. 1081-1089, 2004.

GUO, H.; ECKER, J.R. The ethylene signalling pathway: new insights. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 40-49, 2004.

HALL, M.A.; SMITH, A.R. Ethylene and the response of plants to stress. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, Bulgaria, v. 21, n. 2-3, p. 71–79, 1995.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S.; CRAWFORD, M.A.; BJERVE, K.S.; GEY, K.F. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, p. S715-S725, 1993.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO<sub>2</sub>. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, p. 952-957, 1989.

HAYAKAWA, T.; KANEMATSU, S.; ASADA, K. Occurrence of Cu-Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 25, p. 883-889, 1984.

HE, Y.; HUANG, B. Protein changes during heat stress in three Kentucky Bluegrass cultivars differing in heat tolerance. **Crop Science**, Oxford, v. 47, p. 2513-2520, 2007.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry Biophysics**, Dusseldorf, v. 125, p. 2141-2145, 1968.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. In: \_\_\_\_\_. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University California, Agricultural Experiment Station, 1950. 34 p.

IAKIMOVA, E.T.; WOLTERING, E.J.; KAPCHINA-TOTEVA, V.M.; HARREN, F.J.M.; CRISTESCU, S.M. Cadmium toxicity in cultured tomato cells - role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling. **Cell Biology International**, London, v. 32, p. 1521-1529, 2008.

IGAMBERDIEV, A.U., LEA, P.J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, p. 651-674, 2002.

ISHIKAWA, T.; SAKAI, K.; TAKEDA, T.; SHIGEOKA, S. Cloning and expression of cDNA encoding a new type of ascorbate peroxidase from spinach. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 367, p. 28-32, 1995.

IWAMOTO, M.; MAEKAWA, M.; SAITO, A.; HIGO, H.; HIGO, K. Evolutionary relationship of plant catalase genes inferred from exon-intron structures: isozyme divergence after the separation of monocots and dicots. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 9-19, 1998.

JESPERSEN, H.M.; KJAERSGARD, I.V.H.; OSTERGAARD, L.; WELINDER, K.G. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. **Biochemical Journal**, London, v. 326, p. 305-310, 1997.

JOHNSON, P.R.; ECKER, J.R. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. **Annual Review of Genetics**, Stanford, v. 32, p. 227-254, 1998.

KARIYA, K.; MATSUZAKI, A.; MACHIDA, H.; TSUNODA, K. Distribution of chlorophyll content in leaf blade of rice plant. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v. 51, p. 134-135, 1982.

KELLY, M.O.; BRADFORD, K. J. Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, p. 713-717, 1986.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, London, v. 44, p. 283-307, 1993.

KESSELER, A.; BRAND, M.D. The mechanism of the stimulation of state 4 respiration by cadmium in potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 33, p. 519-528, 1995.

KHADRI, M.; LINA, P.; SOUSSI, M.; LLUCH, C.; OCAÑA, A. Ammonium assimilation and ureide metabolism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. **Agronomy Journal**, Madison, v. 21, p. 635-643, 2001.

KIEGLE, E.; MOORE, C.A.; HASELOFF, J.; TESTER, M.A.; KNIGHT, M.R. Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the Arabidopsis root. **The Plant Journal**, Rockville, v. 23, p. 267-278, 2000.

KLEE, H.; TIEMAN, D. The tomato ethylene receptor gene family: form and function. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, p. 336-341, 2002.

KLEE, H.J. Ethylene signal transduction. Moving beyond arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 660-667, 2004.

KLIEBENSTEIN, D.J.; MONDE, R.A.; LAST, R.L. Superoxide dismutase in arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.637-650, 1998.

KNIGHT H. Calcium signalling during abiotic stress in plants. **International Review of Cytology**, New York, v. 195, p. 269-325, 2000.

KOKA, C.V.; CERNY, R.E.; GARDNER, R.G.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; CLOUSE, S.D. A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 85-98, 2000.

KONICA MINOLTA SENSING. **Manual Chlorophyll meter SPAD-502**. Osaka, 2003. 2 p.

KOORNNEEF, M.; BOSMA, T.D.G.; HANHART, C.J.; VAN DER VEEN, J.H.; ZEEVAART, J.A.D. The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 80, p. 852-857, 1990.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R.N.F. Purification and characterization of novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 1237-1245, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Paris, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALOI, C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signalling : the latest news. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 323-328, 2004.

LASHBROOK, C.; TIEMAN, D.; KLEE, H. Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. **Plant Journal**, Rockville, v. 15, p. 243-252, 1998.

LEE, H.; JO, J.; SON, D. Molecular cloning in characterization of the gene encoding glutathione reductase in *Brassica campestris*. **Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression**, London, v. 1395, p. 309-314, 1998.

LESSER, M.P.; STOCHAJ, W.R. Photoadaptation and protection against active forms of oxygen in the symbiotic procaryote *Prochloron* sp. and its ascidian host. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 1530-1535, 1990.

LIMA, J.E.; CARVALHO, R.F.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. Micro-Msk: a tomato genotype miniature size, short life cycle and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, Amsterdam, v. 167, p. 753-757, 2004.

LONG, S.P.; NAIDU, S.L. Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone. In: BELL, J.N.B.; TRESHOW, M. (Ed.). **Air pollution and plant life**. New York: John Wiley, 2003. p. 69-88.

MAHALINGAM, R.; FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 119, p. 56-68, 2003.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, p. 183-193, 2000.

MALLICK, N.; RAI, L.C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to copper. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, p. 146-149, 1999.

MANDHANIA, S.; MADAN, S.; SAWHNEY, V. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 227, p. 227-231, 2006.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black root. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 13, p. 1091-1101, 1972.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M.E. **Comportamento de cobre, cádmio, crômio, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH**. 1994. 197 p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

MEDIOUNI, C.; BEN, A.W.; HOULNE, G.; CHABOUTE, M.E.; JEMAL, F. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidant response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 57, p. 89–99, 2009.

MEHLHORN, H.; LELANDAIS, M.; KORTH, H.G.; FOYER, C.H. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 378, p. 203–206, 1996.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI A; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997.

MELO, L.C; DOS SANTOS, J.B., RAMALHO, M.A.P. Choice of parents to obtain common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars tolerant to low temperatures at the adult stage. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 283-292, 1997.

MICHAEL, T.P.; McCLUNG, C.R. Phase-specific circadian clock regulatory elements in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 627-638, 2002.

MILLAR, A.H.; MITTOVA, V.; KIDDLE, G.; HEAZLEWOOD, J.L.; BARTOLI, C.G.; THEODOULOU, F.L.; FOYER, C.H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implication for stress responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 443-447, 2003.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B.A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. **Plant Journal**, Oxford, v.5, p.397-405, 1994.

MITTLER, R.; FENG, X.; COHEN, M. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 461-473, 1998.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 33, p. 541-553, 1992.

MOCQUOT, B.; VANGRONVELD, J.; CLIJSTERS, H.; MENCH, M. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. **Plant and Soil**, Hague, v. 182, p. 287-300, 1996.



MOLDES, C.A.; MEDICI, L.O.; ABRAHÃO, O.S.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 30, p. 469-479, 2008.

NASCIMENTO, C.W.A.; PEREIRA, J.B.M. Absorção e distribuição de cádmio e micronutrientes em cultivares de feijoeiro expostas a doses de cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 1303-1308, 1997.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.

OBER, E.S.; SHARP, R.E. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 981-987, 1994.

OLMOS, E.; HERNANDEZ, J.A.; SEVILLA, F.; HELLIN, E. Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt-tolerant cell line of *Pisum sativum*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 144, p. 594-598, 1994.

OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 291-301, 2003.

ORNELLAS, L.C.; NAKAO, F.S.; ROHR, M.R.S.; LEITE-MOR, M.M.B.; PARISE, E.; FERRARI, A.P. Fibronectina biliar no diagnóstico de estenoses biliares. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Brasília, v. 52, p. 331-335, 2006.

OUESLATI, S.; KARRAY-BOURAOUI, N.; ATTIA, H. da; RABHI, M.; KSOURI, R. LACHAAL, M. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, p. 1-8, 2009. DOI 10.1007/s11738-009-0406-0

PAN, S.; YAU, Y. The isozymes of superoxide dismutase in rice. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taiwan, v. 32, p. 253-258, 1991.

- PANAGOPOULOS, I.; BORNMAN, J.F.; BJÖRN, L.O. Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultraweak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Oxford, v. 8, p. 73–87, 1990.
- PANDHAIR, V., SEKHON, B.S. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 15, p. 71-78, 2006.
- PANDOLFIN, T.; GABBRIELLI, R.; CISCATO, N. Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, p. 1611-1627, 1996.
- PELLENC, D.; SCHMITT, E.; GALLET, O. Purification of a plant cell wall ibronectin-like adhesion protein involved in plant response to salt stress. **Protein Expression and Purification**, Oxford, v. 34, p. 208-214, 2004.
- PERFUS-BARBEOCH, L.; LEONHANDT, N.; VAVASSEUR, A.; FORESTIER, C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **Plant Journal**, Oxford, v. 32, p. 539-548, 2002.
- PETRUZZELLI, L.; CORAGGIO, I.; LEUBNER-METZGER, G. Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. **Planta**, Bonn, v. 211, p. 144–149, 2000.
- PITZSCHKE, A., FORNAZI, C., HIRT, H. Reactive oxygen species signalling in plants. **Antioxidants and Redox Signalling**, Columbus, v. 8, p. 1757-1764, 2006.
- PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; HENRIQUE, A.; BRASIL, O.G. Effect of pH on proline content and peroxidase activity in metabolism of sugarcane cultivated *in vitro*. **Agronomia Tropical**, Maracay, v. 53, p. 145-156, 2003.
- PLIETH, C.; HANSEN, U-P.; KNIGHT, H.; KNIGHT, M.R. Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 491-497, 1999.
- POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; VITORELLO, V.A.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 548-552, 2008.

PRASAD, M.N.V. **Plant ecophysiology**. New York: John Wiley, 1997. 542 p.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance en vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 35, p. 525-545, 1995.

PRATT, L.H.; CORDONNIER-PRATT, M.M.; KELMENSEN, P.M.; LAZARANOVA, G.I.; KUBOTA, T.; ALBA, R. M. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant, Cell and Environment**, London, v. 20, p. 672-677, 1997.

RADY, A.A.; EL-SHEEKH, M.M.; MATKOVICS, B. Temperature shift-induced changes in the antioxidant enzyme system of Cyanobacterium synechocystis PCC 6803. **International Journal of Biochemistry**, Bristol, v. 26, p. 433-435, 1994.

RAUSER, W.E. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 1141-1149, 1995.

REINHECKEL, T.; NOACK, H., LORENZ, S., WISWEDEL, I., AUGUSTIN, W. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. **Free Radical Research**, London, v. 29, p. 297-305, 1998.

REUMANN, S., WEBER, A.P.M. Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C-2 cycle have become filled – others remain. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, London, v. 1763, p. 1496-1510, 2006.

RICK, C.; BUTLER, L. Cytogenetics of the tomato. **Advances in Genetics**, New York, v. 8, p. 267–382, 1956.

RODRIGUEZ, F.; ESCH, J.; HALL, A.; BINDER, B.; SCHALLER, G. E.; BLEECKER, A. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 283, p. 996–998, 1999.

RODRIGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; ZABALZA, A.; CORPAS, F.J.; GÓMEZ, M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots: imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. **Plant, Cell and Environment**, London, v. 29, n. 8, p. 1532-1544, 2006.

ROSATI, C.; AQUILANI, R.; DHARMAPURI, S.; PALLARA, P.; MARUSIC, C.; TAVAZZA, R.; BOUVIER, F.; CAMARA, B.; GIULIANO, G. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. **The Plant Journal**, Oxford, v. 24, p. 413-419, 2000.

SAHU, A.C.; SAHOO, S.K.; SAHOO, N. NaCl-stress induced alteration in glutamine synthetase activity in excised senescing leaves of a salt-sensitive and a salt-tolerant rice cultivar in light and darkness. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34, p. 287-292, 2001.

SAIRAM, R.K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 86, p. 407-421, 2004.

SAIRAM, R.K.; RAO, K.V.; SRIVASTAVA, G.C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, Amsterdam, v. 163, p. 1037-1046, 2002.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M.F.; GRACE, S.C.; YAMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, London, v. 177, p. 67-80, 2002.

SALT, D.E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N.P.B.A.; DUSENKOV, V.; ENSLEY, B.D.; CHET, I.; RASKIN, I. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Bio-Technology**, Paris, v. 13, p. 468-474, 1995.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 105-130, 1999.

SANTOS, M.; GOUSSEAU, H.; LISTER, C.; FOYER, C.; CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P. Cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* L. is encoded by a small multigene family. **Planta**, Bonn, v. 198, p. 64-69, 1996.

SARHAN, F.; OUELLET, F.; VAZQUEZ-TELLO, A. The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, p. 439-445, 1997.

SCANDALIOS, J.G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, New York, v. 28, p. 1-41, 1990.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C. H.; MULIUNEUX, P.M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 275- 315.

SCANDALIOS, J.G.; ACEVEDO, A.; RUZSA, S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, Amsterdam, v. 156, p. 103-110, 2000.

SCHALLER, G.E.; BLEECKER, A. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis ETR1* gene. **Science**, Washington, v. 270, p. 1809–1811, 1995.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 39-44, 1999.

SCHÖNER, S.; KRAUSE, G.H. Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. **Planta**, Bonn, v. 180, p. 383-389, 1990.

SCHÜTZENDUBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p.1351-1365, 2002.

SEHMER, L.; DIZENGREMEL, P. Contribution to subcellular localization of superoxide dismutase isoforms of spruce needles and oak leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 53, p. 545-551, 1998.

SEN RAYCHAUDHURI, S., DENG, X.W. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. **The Botanical Review**, New York, v. 66, p. 89-98, 2000.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1305–1319, 2002.

SIEDLECKA, A.; KRUPA, Z. Cd/Fe interaction in higher plants - its consequences for the photosynthetic apparatus. **Photosynthetica**, London, v. 36, p. 321-331, 1999.

SILVEIRA, J.A.G.; ARAÚJO, S.A.M.; LIMA, J.P.M.S.; VIÉGAS, R.A. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 1-8, 2009.

SKADSEN, R.W.; SCHUZELEFERT, P.; HERBST, J.M. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme genes in barley. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v. 29, p. 1005-1014, 1995.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, London, v. 125, p. 27-28, 1993.

SOARES NETTO, L.E. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 24, p. 93-104, 2001.

SOBKOWIAK, R.; DECKERT, J. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 767-772, 2003.

STEVENS, R.G.; CREISSEN, G.P.; MULLINEAUX, P.M. Cloning and characterisation of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v. 35, p. 641-654, 1997.

SULEYMANOV, S.; HUSEYNOVA, I. The synthesis of thylakoid membrane proteins in wheat plants under salt stress. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOSYNTHESIS ALLEN, 14., 2008, Glasgow. **Photosynthesis: energy from the sun; proceedings...** Glasgow: Springer, 2008. chap. 38, p. 1557-1580.

SZABOLCS, I. Prospects of soil salinity for the 21st century. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 15., 1994, Acapulco. **Proceedings...** Acapulco: Mexiko University, 1994. p. 123-141.

TAL, M.; IMBER, D.; EREZ, A.; EPSTEIN, E. Abnormal stomatal behavior and hormonal imbalance in flacca, a wilted mutant of tomato. II. Effect of abscisic acid on indoleacetic acid metabolism and ethylene evolution. **Plant Physiology**, Rockville, v. 63, p. 1044-1048, 1979.

TANAKA, Y.; SANO, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KONDO, N.; HASEZAWA, S. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 2337-2343, 2005.

TAYLOR, I.B.; BURBIDGE, A.; THOMPSON, A.J. Control of abscisic acid synthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 1563-1574, 2000.

THOMAS, J.C.; BOHNERT, H.J. Salt stress preception and plant growth regulators in the halophyte *Mesembry anthemum crystallium*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 1299-1304, 1993.

TIEMAN, D.; KLEE, H. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 165-172, 1999.

TIEMAN, D.M.; TAYLOR, M.G.; CIARDI, J.A.; KLEE, H.J. The tomato ethylene receptors *NR* and *LeETR4* are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 97, p. 5663-5668, 2000.

TORRES, M.A.; DANGL, J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 397-403, 2005.

TUTIC, M.; LU, X.; SCHIRMER, R.H.; WERNER, D. Cloning and sequencing of mammalian glutathione reductase cDNA. **European Journal Biochemistry**, London, v. 188, p. 523, 1990.

VAN LOON, L.C.; GERAATS, B.P.J.; LINTHORST, H.J.M. Ethylene as a modulator of disease ressitande in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, p. 184-191, 2006.

VANCAMP, W.; HÉROUART, D.; WILLEKENS, H.; TAKAHASHI, H.; SAITO, K.; VANMONTAGU, M.; INZÉ, D. Tissue-specific activity of two manganese superoxide dismutase promoters in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 525-535, 1996.

VAZQUEZ-TELLO, A.; OULLET, F.; SARHAN, F. Low temperature-stimulated phosphorylation regulates the binding of nuclear factors to the promoter of *Wcs120*, a cold-specific gene in wheat. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 257, p. 157-166, 1998.

VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 701-710, 2001.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley, 1995. 1361 p.

VRANOVA, E.; INZE, D.; BREUSEGEM, F.V. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1227-1236, 2002.

WAGNER, G.L. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in Agronomy**, New York, v. 51, p. 173-212, 1993.

WILKINSON, J.Q.; LANAHAN, M.B.; YEN, H.C.; GIOVANNONI, J.J.; KLEE, H.J. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. **Science**, Washington, v. 270, p. 1807-1809, 1995.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBAERTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 16, p. 4806-4816, 1997.

WÓJCIK, M.; VANGRONSVELD, J.; TUKIENDORF, A. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*: I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. **Environmental Experimental Botany**, London, v. 53, p. 151-161, 2005.

YADAVA, U.L. A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. **HortScience**, St. Joseph, v. 21, p. 1449-1450, 1986.

YAKIMOVA, E.T.; KAPCHINA, V.M.; LAARHOVEN, L.J.; HARREN, F.M.; WOLTERING, E.J. Involvement of ethylene and lipid signaling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, p. 581-589, 2006.

YANG, J.; MEYERS, K.J.; VAN DER HEIDE, J.; LIU, R.H. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 6787-6793, 2004.

YING, H.C.; CHEN, Y.M.; HUANG, C.Y. Role of glutathione reductase and related enzymes in salt tolerance mechanism of soybean plants grown under salt stress condition. **Taiwania**, Taiwan, v. 44, p. 21-34, 1995.

WANG, Z.F.; YING, T.J. Research progress of ethylene signal transduction in plants. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, Taiwan, v. 30, p. 601-608, 2004.



ZHANG, G.; SLASKI, J.J.; ARCHAMBAULT, D.J.; TAYLOR, J. Aluminum-induced alterations in lipid composition of microsomal membranes from an aluminum-resistant and an aluminum-sensitive cultivar of *Triticum aestivum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 96, p. 683–691, 1996.

ZHAO, M.G.; TIAN, Q.Y.; ZHANG, W.H. Ehtylene activates a plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel in tobacco suspension cells. **New Phytologist**, London, v. 174, p. 507-515, 2007.

ZHU, Y.L.; PILON-SMITS, E.A.H.; JOUANIN, L.; TERRY, N. Overexpression of glutathione synthetase in *Indian mustard* enhances cadmium accumulation and tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.73-79, 1999.

**APÊNDICES**

APÊNDICE A – Análise de variância dos dados provenientes das medições de SPAD em folha. Teste de Tukey com 5% de probabilidade

|         |                |        |          |         |             |            |                      |           |
|---------|----------------|--------|----------|---------|-------------|------------|----------------------|-----------|
| TO      | FV             | GL     | SQ       | QM      | F calculado | F tabelado | Tratamento           | Médias    |
|         | Tratamentos    | 5      | 8,1092   | 1,6218  | 1,2979      | 4,39       | MT C                 | 42,15 a   |
|         | Resíduo        | 6      | 7,4975   | 1,2496  |             |            | MT NaCl              | 43,35 a   |
|         | Total          | 11     | 15,6067  |         |             |            | MT CdCl <sub>2</sub> | 43,05 a   |
|         | $\Delta$ Tukey | 4,4502 |          |         |             |            | Nr C                 | 43,57 a   |
|         | CV %           | 2,57   |          |         |             |            | Nr NaCl              | 43,92 a   |
|         |                |        |          |         |             |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 44,85 a   |
| 7 dias  | FV             | GL     | SQ       | QM      | F calculado | F tabelado | Tratamento           | Médias    |
|         | Tratamentos    | 5      | 23,8035  | 4,7607  | 12,2396     | 4,39       | MT C                 | 40,27 c   |
|         | Resíduo        | 6      | 2,3337   | 0,3890  |             |            | MT NaCl              | 43,85 a   |
|         | Total          | 11     | 26,1373  |         |             |            | MT CdCl <sub>2</sub> | 41,10 bc  |
|         | $\Delta$ Tukey | 2,4828 |          |         |             |            | Nr C                 | 43,47 ab  |
|         | CV %           | 1,46   |          |         |             |            | Nr NaCl              | 43,82 a   |
|         |                |        |          |         |             |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 43,25 ab  |
| 14 dias | FV             | GL     | SQ       | QM      | F calculado | F tabelado | Tratamento           | Médias    |
|         | Tratamentos    | 5      | 28,0760  | 5,6152  | 11,7545     | 4,39       | MT C                 | 39,37 c   |
|         | Resíduo        | 6      | 2,8663   | 0,4777  |             |            | MT NaCl              | 39,02 c   |
|         | Total          | 11     | 30,9423  |         |             |            | MT CdCl <sub>2</sub> | 39,37 c   |
|         | $\Delta$ Tukey | 2,7515 |          |         |             |            | Nr C                 | 42,32 ab  |
|         | CV %           | 1,70   |          |         |             |            | Nr NaCl              | 43,10 a   |
|         |                |        |          |         |             |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 40,52 abc |
| 21 dias | FV             | GL     | SQ       | QM      | F calculado | F tabelado | Tratamento           | Médias    |
|         | Tratamentos    | 5      | 8,2742   | 1,6548  | 1,9642      | 4,39       | MT C                 | 37,55 a   |
|         | Resíduo        | 6      | 5,0550   | 0,8425  |             |            | MT NaCl              | 38,15 a   |
|         | Total          | 11     | 13,3292  |         |             |            | MT CdCl <sub>2</sub> | 39,30 a   |
|         | $\Delta$ Tukey | 3,6541 |          |         |             |            | Nr C                 | 39,60 a   |
|         | CV %           | 2,36   |          |         |             |            | Nr NaCl              | 39,90 a   |
|         |                |        |          |         |             |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 38,55 a   |
| 28 dias | FV             | GL     | SQ       | QM      | F calculado | F tabelado | Tratamento           | Médias    |
|         | Tratamentos    | 5      | 123,6042 | 24,7208 | 26,3689     | 4,39       | MT C                 | 38,95 a   |
|         | Resíduo        | 6      | 5,6250   | 0,9375  |             |            | MT NaCl              | 37,40 ab  |
|         | Total          | 11     | 129,2292 |         |             |            | MT CdCl <sub>2</sub> | 30,40 c   |
|         | $\Delta$ Tukey | 3,8546 |          |         |             |            | Nr C                 | 37,90 ab  |
|         | CV %           | 2,64   |          |         |             |            | Nr NaCl              | 40,20 a   |
|         |                |        |          |         |             |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 35,00 b   |
| 35 dias | FV             | GL     | SQ       | QM      | F calculado | F tabelado | Tratamento           | Médias    |
|         | Tratamentos    | 5      | 135,5267 | 27,1053 | 144,2412    | 4,39       | MT C                 | 36,47 a   |
|         | Resíduo        | 6      | 1,1275   | 0,1879  |             |            | MT NaCl              | 37,05 a   |
|         | Total          | 11     | 136,6542 |         |             |            | MT CdCl <sub>2</sub> | 27,80 c   |
|         | $\Delta$ Tukey | 1,7257 |          |         |             |            | Nr C                 | 37,22 a   |
|         | CV %           | 1,25   |          |         |             |            | Nr NaCl              | 36,25 a   |
|         |                |        |          |         |             |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 33,05 b   |

APÊNDICE B – Análise de variância dos dados provenientes das quantificações de MDA em folha, raiz e fruto.  
 Teste de Tukey com 5% de probabilidade

|                  |                |        |         |        |             |                      |                      |           |
|------------------|----------------|--------|---------|--------|-------------|----------------------|----------------------|-----------|
| FOLHA<br>7 dias  | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 5,2262  | 1,0452 | 29,2532     | 4,39                 | MT C                 | 1,8308 bc |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,2144  | 0,0357 |             |                      | MT NaCl              | 3,5140 a  |
|                  | Total          | 11     | 5,4406  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 3,0428 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,7525 |         |        |             |                      | Nr C                 | 1,5934 c  |
| CV %             | 7,51           |        |         |        |             | Nr NaCl              | 2,6484 b             |           |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 2,4771 b             |           |
| FOLHA<br>20 dias | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 3,3140  | 0,6628 | 12,3001     | 4,39                 | MT C                 | 2,3202 c  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,3233  | 0,0539 |             |                      | MT NaCl              | 2,6903 bc |
|                  | Total          | 11     | 3,6373  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 3,6211 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,9241 |         |        |             |                      | Nr C                 | 2,4637 c  |
| CV %             | 7,73           |        |         |        |             | Nr NaCl              | 3,4640 ab            |           |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 3,4586 ab            |           |
| FOLHA<br>36 dias | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 13,9478 | 2,7896 | 46,5643     | 4,39                 | MT C                 | 2,0824 cd |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,3594  | 0,0599 |             |                      | MT NaCl              | 3,4061 b  |
|                  | Total          | 11     | 14,3073 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 5,0371 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,9744 |         |        |             |                      | Nr C                 | 1,7938 d  |
| CV %             | 7,80           |        |         |        |             | Nr NaCl              | 2,8390 bc            |           |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 3,6661 b             |           |
| RAIZ<br>7 dias   | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 0,1253  | 0,0251 | 28,5067     | 4,39                 | MT C                 | 0,3291 d  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,0053  | 0,0009 |             |                      | MT NaCl              | 0,4973 b  |
|                  | Total          | 11     | 0,1306  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,6317 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,1180 |         |        |             |                      | Nr C                 | 0,3570 cd |
| CV %             | 6,66           |        |         |        |             | Nr NaCl              | 0,408 bcd            |           |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,4567 bc            |           |
| RAIZ<br>20 dias  | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 0,1631  | 0,0326 | 4,3887      | 4,39                 | MT C                 | 0,2713 a  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,0445  | 0,0074 |             |                      | MT NaCl              | 0,2828 a  |
|                  | Total          | 11     | 0,2076  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,3659 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,3428 |         |        |             |                      | Nr C                 | 0,2904 a  |
| CV %             | 22,59          |        |         |        |             | Nr NaCl              | 0,5062 a             |           |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,5702 a             |           |
| RAIZ<br>36 dias  | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 0,2785  | 0,0557 | 33,9595     | 4,39                 | MT C                 | 0,2532 c  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,0098  | 0,0016 |             |                      | MT NaCl              | 0,5478 ab |
|                  | Total          | 11     | 0,2883  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,4054 bc |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,1612 |         |        |             |                      | Nr C                 | 0,2677 c  |
| CV %             | 9,99           |        |         |        |             | Nr NaCl              | 0,3075 c             |           |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,6591 a             |           |
| FRUTO<br>36 dias | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 0,4898  | 0,0980 | 23,7732     | 4,39                 | MT C                 | 1,3382 c  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,0247  | 0,0041 |             |                      | MT NaCl              | 1,8909 a  |
|                  | Total          | 11     | 0,5146  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 1,5086 bc |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,2556 |         |        |             |                      | Nr C                 | 1,3312 c  |
| CV %             | 4,27           |        |         |        |             | Nr NaCl              | 1,5989 b             |           |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 1,3339 c             |           |

APÊNDICE C – Análise de variância dos dados provenientes das quantificações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folha, raiz e fruto.  
 Teste de Tukey com 5% de probabilidade

|                  |             |        |        |        |             |                      |                      |           |
|------------------|-------------|--------|--------|--------|-------------|----------------------|----------------------|-----------|
| FOLHA<br>7 dias  | FV          | GL     | SQ     | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos | 5      | 0,3423 | 0,0685 | 54,0745     | 4,39                 | MT C                 | 0,6178 bc |
|                  | Resíduo     | 6      | 0,0076 | 0,0013 |             |                      | MT NaCl              | 1,0038 a  |
|                  | Total       | 11     | 0,3499 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,9415 a  |
|                  | ΔTukey      | 0,1417 |        |        |             |                      | Nr C                 | 0,6077 c  |
|                  | CV %        | 4,33   |        |        |             | Nr NaCl              | 1,0016 a             |           |
|                  |             |        |        |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,7565 b             |           |
| FOLHA<br>20 dias | FV          | GL     | SQ     | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos | 5      | 0,7622 | 0,1524 | 76,3203     | 4,39                 | MT C                 | 0,8321 c  |
|                  | Resíduo     | 6      | 0,0120 | 0,0020 |             |                      | MT NaCl              | 1,1098 b  |
|                  | Total       | 11     | 0,7742 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 1,3385 a  |
|                  | ΔTukey      | 0,1779 |        |        |             |                      | Nr C                 | 0,6776 c  |
|                  | CV %        | 4,49   |        |        |             | Nr NaCl              | 0,7586 c             |           |
|                  |             |        |        |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 1,2534 ab            |           |
| FOLHA<br>36 dias | FV          | GL     | SQ     | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos | 5      | 1,4923 | 0,2985 | 32,0363     | 4,39                 | MT C                 | 0,5681 cd |
|                  | Resíduo     | 6      | 0,0559 | 0,0093 |             |                      | MT NaCl              | 0,9505 bc |
|                  | Total       | 11     | 1,5482 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 1,5548 a  |
|                  | ΔTukey      | 0,3842 |        |        |             |                      | Nr C                 | 0,5076 d  |
|                  | CV %        | 10,70  |        |        |             | Nr NaCl              | 0,7564 bcd           |           |
|                  |             |        |        |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 1,0736 b             |           |
| RAIZ<br>7 dias   | FV          | GL     | SQ     | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos | 5      | 0,0017 | 0,0003 | 30,5686     | 4,39                 | MT C                 | 0,0653 c  |
|                  | Resíduo     | 6      | 0,0001 | 0,0000 |             |                      | MT NaCl              | 0,0779 bc |
|                  | Total       | 11     | 0,0017 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,0868 ab |
|                  | ΔTukey      | 0,0132 |        |        |             |                      | Nr C                 | 0,0658 c  |
|                  | CV %        | 4,10   |        |        |             | Nr NaCl              | 0,0939 a             |           |
|                  |             |        |        |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,0932 a             |           |
| RAIZ<br>20 dias  | FV          | GL     | SQ     | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos | 5      | 0,0051 | 0,0010 | 63,1315     | 4,39                 | MT C                 | 0,0159 c  |
|                  | Resíduo     | 6      | 0,0001 | 0,0000 |             |                      | MT NaCl              | 0,0401 b  |
|                  | Total       | 11     | 0,0052 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,0506 b  |
|                  | ΔTukey      | 0,0161 |        |        |             |                      | Nr C                 | 0,0188 c  |
|                  | CV %        | 9,51   |        |        |             | Nr NaCl              | 0,0534 b             |           |
|                  |             |        |        |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,0758 a             |           |
| RAIZ<br>36 dias  | FV          | GL     | SQ     | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos | 5      | 0,0057 | 0,0011 | 40,0286     | 4,39                 | MT C                 | 0,0394 b  |
|                  | Resíduo     | 6      | 0,0002 | 0,0000 |             |                      | MT NaCl              | 0,0485 b  |
|                  | Total       | 11     | 0,0058 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,0912 a  |
|                  | ΔTukey      | 0,0212 |        |        |             |                      | Nr C                 | 0,0347 b  |
|                  | CV %        | 9,03   |        |        |             | Nr NaCl              | 0,0544 b             |           |
|                  |             |        |        |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,0852 a             |           |
| FRUTO<br>36 dias | FV          | GL     | SQ     | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos | 5      | 0,4871 | 0,0974 | 88,1675     | 4,39                 | MT C                 | 0,2511 c  |
|                  | Resíduo     | 6      | 0,0066 | 0,0011 |             |                      | MT NaCl              | 0,5052 b  |
|                  | Total       | 11     | 0,4937 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,4109 b  |
|                  | ΔTukey      | 0,1323 |        |        |             |                      | Nr C                 | 0,3746 bc |
|                  | CV %        | 6,42   |        |        |             | Nr NaCl              | 0,7675 a             |           |
|                  |             |        |        |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,7970 a             |           |

APÊNDICE D – Análise de variância dos dados provenientes da atividade de catalase em folha, raiz e fruto. Teste de Tukey com 5% de probabilidade

|                  |                |         |            |           |             |                      |                      |            |
|------------------|----------------|---------|------------|-----------|-------------|----------------------|----------------------|------------|
| FOLHA<br>7 dias  | FV             | GL      | SQ         | QM        | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias     |
|                  | Tratamentos    | 5       | 4392,1367  | 878,4273  | 42,7407     | 4,39                 | MT C                 | 35,0649 c  |
|                  | Resíduo        | 6       | 123,3149   | 20,5525   |             |                      | MT NaCl              | 58,8656 b  |
|                  | Total          | 11      | 4515,4516  |           |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 89,1956 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 18,0478 |            |           |             |                      | Nr C                 | 33,0081 c  |
| CV %             | 8,08           |         |            |           |             | Nr NaCl              | 53,8406 b            |            |
|                  |                |         |            |           |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 66,6964 b            |            |
| FOLHA<br>20 dias | FV             | GL      | SQ         | QM        | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias     |
|                  | Tratamentos    | 5       | 2686,1678  | 537,2336  | 21,1803     | 4,39                 | MT C                 | 31,8871 bc |
|                  | Resíduo        | 6       | 152,1886   | 25,3648   |             |                      | MT NaCl              | 41,7111 bc |
|                  | Total          | 11      | 2838,3564  |           |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 71,2714 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 20,0497 |            |           |             |                      | Nr C                 | 24,2799 c  |
| CV %             | 11,30          |         |            |           |             | Nr NaCl              | 46,9730 b            |            |
|                  |                |         |            |           |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 51,1751 b            |            |
| FOLHA<br>36 dias | FV             | GL      | SQ         | QM        | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias     |
|                  | Tratamentos    | 5       | 4824,6573  | 964,9315  | 214,6261    | 4,39                 | MT C                 | 43,0465 d  |
|                  | Resíduo        | 6       | 26,9752    | 4,4959    |             |                      | MT NaCl              | 67,0683 c  |
|                  | Total          | 11      | 4851,6325  |           |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 83,6382 b  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 8,4411  |            |           |             |                      | Nr C                 | 44,1256 d  |
| CV %             | 3,17           |         |            |           |             | Nr NaCl              | 64,5122 c            |            |
|                  |                |         |            |           |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 99,1299 a            |            |
| RAIZ<br>7 dias   | FV             | GL      | SQ         | QM        | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias     |
|                  | Tratamentos    | 5       | 2756,2611  | 551,2522  | 43,7834     | 4,39                 | MT C                 | 43,3810 b  |
|                  | Resíduo        | 6       | 75,5427    | 12,5905   |             |                      | MT NaCl              | 56,7443 b  |
|                  | Total          | 11      | 2831,8038  |           |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 77,7877 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 14,1258 |            |           |             |                      | Nr C                 | 43,4700 b  |
| CV %             | 6,16           |         |            |           |             | Nr NaCl              | 45,7708 b            |            |
|                  |                |         |            |           |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 78,2905 a            |            |
| RAIZ<br>20 dias  | FV             | GL      | SQ         | QM        | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias     |
|                  | Tratamentos    | 5       | 585,2120   | 117,0424  | 19,5720     | 4,39                 | MT C                 | 45,0390 c  |
|                  | Resíduo        | 6       | 35,8806    | 5,9801    |             |                      | MT NaCl              | 54,5345 bc |
|                  | Total          | 11      | 621,0927   |           |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 56,6305 ab |
|                  | $\Delta$ Tukey | 9,7353  |            |           |             |                      | Nr C                 | 48,2875 bc |
| CV %             | 4,62           |         |            |           |             | Nr NaCl              | 47,2404 bc           |            |
|                  |                |         |            |           |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 65,5853 a            |            |
| RAIZ<br>36 dias  | FV             | GL      | SQ         | QM        | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias     |
|                  | Tratamentos    | 5       | 16952,5858 | 3390,5172 | 267,2309    | 4,39                 | MT C                 | 40,9343 d  |
|                  | Resíduo        | 6       | 76,1256    | 12,6876   |             |                      | MT NaCl              | 63,6066 c  |
|                  | Total          | 11      | 17028,7114 |           |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 145,1591 a |
|                  | $\Delta$ Tukey | 14,1802 |            |           |             |                      | Nr C                 | 44,1346 d  |
| CV %             | 4,62           |         |            |           |             | Nr NaCl              | 60,1887 c            |            |
|                  |                |         |            |           |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 108,4291 b           |            |
| FRUTO<br>36 dias | FV             | GL      | SQ         | QM        | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias     |
|                  | Tratamentos    | 5       | 65,2321    | 13,0464   | 21,7432     | 4,39                 | MT C                 | 24,4813 ab |
|                  | Resíduo        | 6       | 3,6001     | 0,6000    |             |                      | MT NaCl              | 20,7767 c  |
|                  | Total          | 11      | 68,8322    |           |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 24,9679 ab |
|                  | $\Delta$ Tukey | 3,0837  |            |           |             |                      | Nr C                 | 23,5359 bc |
| CV %             | 3,27           |         |            |           |             | Nr NaCl              | 20,9592 c            |            |
|                  |                |         |            |           |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 27,4833 a            |            |

APÊNDICE E – Análise de variância dos dados provenientes da atividade de glutatona redutase em folha, raiz e fruto. Teste de Tukey com 5% de probabilidade

|                  |                |        |         |        |             |                      |                      |           |
|------------------|----------------|--------|---------|--------|-------------|----------------------|----------------------|-----------|
| FOLHA<br>7 dias  | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 0,0138  | 0,0028 | 36,1730     | 4,39                 | MT C                 | 0,0790 c  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,0005  | 0,0001 |             |                      | MT NaCl              | 0,1174 b  |
|                  | Total          | 11     | 0,0142  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,1656 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,0348 |         |        |             |                      | Nr C                 | 0,0938 bc |
|                  | CV %           | 6,79   |         |        |             |                      | Nr NaCl              | 0,1556 a  |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,1602 a             |           |
| FOLHA<br>20 dias | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 0,0106  | 0,0021 | 33,8503     | 4,39                 | MT C                 | 0,0866 c  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,0004  | 0,0001 |             |                      | MT NaCl              | 0,1430 ab |
|                  | Total          | 11     | 0,0110  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,1549 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,0316 |         |        |             |                      | Nr C                 | 0,0868 c  |
|                  | CV %           | 6,34   |         |        |             |                      | Nr NaCl              | 0,1200 b  |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,1549 a             |           |
| FOLHA<br>36 dias | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 0,0580  | 0,0116 | 35,5146     | 4,39                 | MT C                 | 0,0780 c  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,0020  | 0,0003 |             |                      | MT NaCl              | 0,1935 b  |
|                  | Total          | 11     | 0,0599  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,2126 b  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,0719 |         |        |             |                      | Nr C                 | 0,1125 c  |
|                  | CV %           | 10,46  |         |        |             |                      | Nr NaCl              | 0,1492 bc |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,2902 a             |           |
| RAIZ<br>7 dias   | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 3,8222  | 0,7644 | 346,3754    | 4,39                 | MT C                 | 2,2824 c  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,0132  | 0,0022 |             |                      | MT NaCl              | 3,3234 b  |
|                  | Total          | 11     | 3,8355  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 3,3443 ab |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,1870 |         |        |             |                      | Nr C                 | 2,1087 c  |
|                  | CV %           | 1,04   |         |        |             |                      | Nr NaCl              | 3,5107 a  |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 3,3443 ab            |           |
| RAIZ<br>20 dias  | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 11,9545 | 2,3909 | 72,2635     | 4,39                 | MT C                 | 2,2340 d  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,1985  | 0,0331 |             |                      | MT NaCl              | 4,6440 a  |
|                  | Total          | 11     | 12,1530 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 3,9565 ab |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,7241 |         |        |             |                      | Nr C                 | 1,7273 d  |
|                  | CV %           | 5,66   |         |        |             |                      | Nr NaCl              | 3,0536 c  |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 3,6440 bc            |           |
| RAIZ<br>36 dias  | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 31,8774 | 6,3755 | 141,3012    | 4,39                 | MT C                 | 2,2751 d  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,2707  | 0,0451 |             |                      | MT NaCl              | 4,2697 c  |
|                  | Total          | 11     | 32,1481 |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 7,1515 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,8456 |         |        |             |                      | Nr C                 | 2,6527 d  |
|                  | CV %           | 4,88   |         |        |             |                      | Nr NaCl              | 4,4434 c  |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 5,2929 b             |           |
| FRUTO<br>36 dias | FV             | GL     | SQ      | QM     | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5      | 0,0243  | 0,0049 | 7,2254      | 4,39                 | MT C                 | 0,8008 a  |
|                  | Resíduo        | 6      | 0,0040  | 0,0007 |             |                      | MT NaCl              | 0,7819 ab |
|                  | Total          | 11     | 0,0283  |        |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 0,8094 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 0,1032 |         |        |             |                      | Nr C                 | 0,6930 b  |
|                  | CV %           | 3,38   |         |        |             |                      | Nr NaCl              | 0,7142 ab |
|                  |                |        |         |        |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 0,7938 ab            |           |

APÊNDICE F – Análise de variância dos dados provenientes da atividade de ascorbato peroxidase em folha, raiz e fruto. Teste de Tukey com 5% de probabilidade

|                  |                |          |            |            |             |                      |                      |             |
|------------------|----------------|----------|------------|------------|-------------|----------------------|----------------------|-------------|
| FOLHA<br>7 dias  | FV             | GL       | SQ         | QM         | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias      |
|                  | Tratamentos    | 5        | 18164,2067 | 3632,8413  | 1,2364      | 4,39                 | MT C                 | 417,1351 a  |
|                  | Resíduo        | 6        | 17629,4630 | 2938,2438  |             |                      | MT NaCl              | 482,6511 a  |
|                  | Total          | 11       | 35793,6697 |            |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 484,4885 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 215,7930 |            |            |             |                      | Nr C                 | 536,4484 a  |
|                  | CV %           | 11,00    |            |            |             |                      | Nr NaCl              | 514,2635 a  |
|                  |                |          |            |            |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 521,4184 a           |             |
| FOLHA<br>20 dias | FV             | GL       | SQ         | QM         | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias      |
|                  | Tratamentos    | 5        | 68765,2699 | 13753,0540 | 20,1284     | 4,39                 | MT C                 | 286,6613 b  |
|                  | Resíduo        | 6        | 4099,5952  | 683,2659   |             |                      | MT NaCl              | 306,4036 b  |
|                  | Total          | 11       | 72864,8651 |            |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 372,0329 b  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 104,0611 |            |            |             |                      | Nr C                 | 345,8862 b  |
|                  | CV %           | 7,44     |            |            |             |                      | Nr NaCl              | 289,8549 b  |
|                  |                |          |            |            |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 506,0716 a           |             |
| FOLHA<br>36 dias | FV             | GL       | SQ         | QM         | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias      |
|                  | Tratamentos    | 5        | 468177,380 | 93635,4761 | 147,8721    | 4,39                 | MT C                 | 266,5080 c  |
|                  | Resíduo        | 6        | 3799,3174  | 633,2196   |             |                      | MT NaCl              | 551,7658 b  |
|                  | Total          | 11       | 471976,698 |            |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 668,6435 a  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 100,1776 |            |            |             |                      | Nr C                 | 166,2157 d  |
|                  | CV %           | 5,37     |            |            |             |                      | Nr NaCl              | 453,2165 b  |
|                  |                |          |            |            |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 702,3564 a           |             |
| RAIZ<br>7 dias   | FV             | GL       | SQ         | QM         | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias      |
|                  | Tratamentos    | 5        | 505006,698 | 101001,339 | 16,5841     | 4,39                 | MT C                 | 1453,2314 a |
|                  | Resíduo        | 6        | 36541,4379 | 6090,2397  |             |                      | MT NaCl              | 1310,343 ab |
|                  | Total          | 11       | 541548,136 |            |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 1263,045 ab |
|                  | $\Delta$ Tukey | 310,6781 |            |            |             |                      | Nr C                 | 1226,381 ab |
|                  | CV %           | 6,54     |            |            |             |                      | Nr NaCl              | 1107,9859 b |
|                  |                |          |            |            |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 795,8026 c           |             |
| RAIZ<br>20 dias  | FV             | GL       | SQ         | QM         | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias      |
|                  | Tratamentos    | 5        | 414921,105 | 82984,2210 | 15,7473     | 4,39                 | MT C                 | 832,8185 b  |
|                  | Resíduo        | 6        | 31618,5225 | 5269,7537  |             |                      | MT NaCl              | 750,5542 b  |
|                  | Total          | 11       | 446539,627 |            |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 849,4069 b  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 288,9938 |            |            |             |                      | Nr C                 | 977,0771 b  |
|                  | CV %           | 7,70     |            |            |             |                      | Nr NaCl              | 1327,2237 a |
|                  |                |          |            |            |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 915,7823 b           |             |
| RAIZ<br>36 dias  | FV             | GL       | SQ         | QM         | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias      |
|                  | Tratamentos    | 5        | 464686,318 | 92937,263  | 10,5604     | 4,39                 | MT C                 | 1278,5722 a |
|                  | Resíduo        | 6        | 52803,2305 | 8800,5384  |             |                      | MT NaCl              | 1365,2878 a |
|                  | Total          | 11       | 517489,549 |            |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 826,4129 b  |
|                  | $\Delta$ Tukey | 373,4634 |            |            |             |                      | Nr C                 | 876,5829 b  |
|                  | CV %           | 8,70     |            |            |             |                      | Nr NaCl              | 1113,016 ab |
|                  |                |          |            |            |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 1010,992 ab          |             |
| FRUTO<br>36 dias | FV             | GL       | SQ         | QM         | F calculado | F tabelado           | Tratamento           | Médias      |
|                  | Tratamentos    | 5        | 604995,18  | 120999,03  | 4,1961      | 4,39                 | MT C                 | 1208,96 a   |
|                  | Resíduo        | 6        | 173015,86  | 28835,97   |             |                      | MT NaCl              | 1702,31 a   |
|                  | Total          | 11       | 778011,04  |            |             |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 1253,34 a   |
|                  | $\Delta$ Tukey | 676,0219 |            |            |             |                      | Nr C                 | 1302,61 a   |
|                  | CV %           | 12,41    |            |            |             |                      | Nr NaCl              | 1100,03 a   |
|                  |                |          |            |            |             | Nr CdCl <sub>2</sub> | 1644,06 a            |             |



APÊNDICE G – Análise de variância dos dados provenientes da atividade de guaiacol peroxidase em folha, raiz e fruto. Teste de Tukey com 5% de probabilidade

|                  |                |          |             |           |            |                      |                      |           |
|------------------|----------------|----------|-------------|-----------|------------|----------------------|----------------------|-----------|
| FOLHA<br>7 dias  | FV             | GL       | SQ          | QM        | Fcalculado | Ftabelado            | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5        | 11864,4567  | 2372,8913 | 44,2495    | 4,39                 | MT C                 | 76,263 b  |
|                  | Resíduo        | 6        | 321,7519    | 53,6253   |            |                      | MT NaCl              | 93,8944 b |
|                  | Total          | 11       | 12186,2086  |           |            |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 133,871 a |
|                  | $\Delta$ Tukey | 29,1527  |             |           |            |                      | Nr C                 | 45,7452 c |
|                  | CV %           | 7,32     |             |           |            |                      | Nr NaCl              | 123,642 a |
|                  |                |          |             |           |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 126,109 a            |           |
| FOLHA<br>20 dias | FV             | GL       | SQ          | QM        | Fcalculado | Ftabelado            | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5        | 13614,6182  | 2722,9236 | 41,0120    | 4,39                 | MT C                 | 47,234 cd |
|                  | Resíduo        | 6        | 398,3604    | 66,3934   |            |                      | MT NaCl              | 73,662 bc |
|                  | Total          | 11       | 14012,9787  |           |            |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 116,010 a |
|                  | $\Delta$ Tukey | 32,4381  |             |           |            |                      | Nr C                 | 40,5340 d |
|                  | CV %           | 9,63     |             |           |            |                      | Nr NaCl              | 99,303 ab |
|                  |                |          |             |           |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 130,934 a            |           |
| FOLHA<br>36 dias | FV             | GL       | SQ          | QM        | Fcalculado | Ftabelado            | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5        | 2738,2147   | 547,6429  | 62,9844    | 4,39                 | MT C                 | 14,803 c  |
|                  | Resíduo        | 6        | 52,1694     | 8,6949    |            |                      | MT NaCl              | 28,753 b  |
|                  | Total          | 11       | 2790,3841   |           |            |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 49,4716 a |
|                  | $\Delta$ Tukey | 11,7389  |             |           |            |                      | Nr C                 | 15,5301 c |
|                  | CV %           | 9,50     |             |           |            |                      | Nr NaCl              | 24,714 bc |
|                  |                |          |             |           |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 52,9476 a            |           |
| RAIZ<br>7 dias   | FV             | GL       | SQ          | QM        | Fcalculado | Ftabelado            | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5        | 318063,6935 | 63612,738 | 85,6274    | 4,39                 | MT C                 | 124,091 d |
|                  | Resíduo        | 6        | 4457,4107   | 742,9018  |            |                      | MT NaCl              | 537,385 a |
|                  | Total          | 11       | 322521,1041 |           |            |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 412,38 bc |
|                  | $\Delta$ Tukey | 108,5073 |             |           |            |                      | Nr C                 | 124,417 d |
|                  | CV %           | 8,15     |             |           |            |                      | Nr NaCl              | 319,486 c |
|                  |                |          |             |           |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 486,72 ab            |           |
| RAIZ<br>20 dias  | FV             | GL       | SQ          | QM        | Fcalculado | Ftabelado            | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5        | 413368,0762 | 82673,615 | 134,7215   | 4,39                 | MT C                 | 204,868 d |
|                  | Resíduo        | 6        | 3681,9798   | 613,6633  |            |                      | MT NaCl              | 706,171 a |
|                  | Total          | 11       | 417050,0560 |           |            |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 439,480 c |
|                  | $\Delta$ Tukey | 98,6185  |             |           |            |                      | Nr C                 | 210,460 d |
|                  | CV %           | 5,65     |             |           |            |                      | Nr NaCl              | 605,574 b |
|                  |                |          |             |           |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 461,662 c            |           |
| RAIZ<br>36 dias  | FV             | GL       | SQ          | QM        | Fcalculado | Ftabelado            | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5        | 292505,8289 | 58501,165 | 52,0777    | 4,39                 | MT C                 | 380,154 a |
|                  | Resíduo        | 6        | 6740,0664   | 1123,3444 |            |                      | MT NaCl              | 464,823 a |
|                  | Total          | 11       | 299245,8953 |           |            |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 433,702 a |
|                  | $\Delta$ Tukey | 133,4289 |             |           |            |                      | Nr C                 | 63,6518 b |
|                  | CV %           | 12,18    |             |           |            |                      | Nr NaCl              | 153,816 b |
|                  |                |          |             |           |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 154,076 b            |           |
| FRUTO<br>36 dias | FV             | GL       | SQ          | QM        | Fcalculado | Ftabelado            | Tratamento           | Médias    |
|                  | Tratamentos    | 5        | 5209,708    | 1041,941  | 36,0304    | 4,39                 | MT C                 | 69,330 cd |
|                  | Resíduo        | 6        | 173,5105    | 28,9184   |            |                      | MT NaCl              | 95,309 b  |
|                  | Total          | 11       | 5383,2193   |           |            |                      | MT CdCl <sub>2</sub> | 94,4964 b |
|                  | $\Delta$ Tukey | 21,4082  |             |           |            |                      | Nr C                 | 58,8845 d |
|                  | CV %           |          |             |           |            |                      | Nr NaCl              | 124,248 a |
|                  |                |          |             |           |            | Nr CdCl <sub>2</sub> | 88,298 bc            |           |