

ESTRESSE SALINO: ALTERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO E DESDOBRAMENTOS EM PADRÕES EPIGENÉTICOS DO MILHO

SALT STRESS: DEVELOPMENT MODIFICATIONS AND EFFECTS IN EPIGENETIC PATTERNS OF MAIZE

Ludmilla Silva Freitas¹

Aline Finger Teixeira²

Camila Clozato Lara³

Resumo: As plantas acionam mecanismos para tolerar condições ambientais adversas, como a salinidade. Esses mecanismos se devem, em parte, à regulação epigenética, modificações do genoma que não envolvem uma mudança na sequência do DNA e ocorrem principalmente no seu padrão de metilação. Visto o problema da salinidade para a produção, foi testada, neste trabalho, a influência do estresse salino no crescimento do milho (*Zea mays*) e investigados os possíveis desdobramentos desse estresse no padrão de metilação global dos indivíduos. No sistema teste, oito plantas foram tratadas com 100µM de cloreto de sódio periodicamente e com uma aplicação de 500µM (T-100/500). O grupo T100-500 reduziu, em relação ao controle, o crescimento em 44,4%, a biomassa fresca em 74,3% e a biomassa seca em 69,2%. O DNA genômico, extraído a partir das folhas, apresentou concentração entre 611,4 ng/uL a 1234,9 ng/uL para os indivíduos amostrados e alto grau de pureza. Não foi observada diferença significativa de metilação global entre o grupo controle e T100-500 (controle: 15,10%; T100-500: 15,63%). Outras oito plantas receberam apenas a aplicação de 500µM de NaCl (CT-500). O CT-500 reduziu o crescimento em 18,3%, a biomassa fresca em 23,6% e a biomassa seca em 30,8% e apresentou menor porcentagem de metilação (10,94%). Os resultados dessa pesquisa apontam para uma clara influência negativa do estresse salino no desenvolvimento do milho. Entretanto, ainda são necessários mais testes para esclarecer a relação da exposição à salinidade com o crescimento da planta e seu padrão epigenético de metilação.

Palavras-chave: Salinidade. *Zea mays*. Epigenética vegetal. Metilação global.

Abstract: Plants trigger mechanisms to tolerate adverse environmental conditions, such as salinity. These mechanisms are partly due to epigenetic regulation, genome modifications that do not involve a change in DNA sequence and occur primarily in its methylation pattern. Given the problem of salinity for production, was tested, in this work, the influence of salt stress on maize (*Zea mays*) growth and the possible consequences of this stress in the global

¹ Acadêmica de Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá, ludmilla.freitas@outlook.com.

² Técnica da área de Biologia, Instituto Federal do Paraná, Campus Paranavaí, aline.finger@ifpr.edu.br.

³ Docente da área de Biologia, Instituto Federal do Paraná, Campus Paranavaí, camila.lara@ifpr.edu.br.

methylation pattern of individuals were investigated. In the test system, eight plants were periodically treated with 100 μM of NaCl and an application of 500 μM of NaCl (T100-500). The T100-500 group reduced, in relation to the control, the growth by 44.4%, the fresh biomass by 74.3% and the dry biomass by 69.2%. The genomic DNA, extracted from the leaves, showed a concentration between 611.4 ng / μL to 1234.9 ng/ μL for the individuals sampled and high degree of purity. There was no significant difference in overall methylation between the control group and T100-500 (control: 15.10%; T100-500: 15.63%). Another eight plants received only 500 μM of NaCl (CT-500). The CT-500 reduced growth by 18.3%, fresh biomass by 23.6% and dry biomass by 30.8% and had a lower percentage of methylation (10.94%). The results of this research point to a clear negative influence of salt stress on maize development. However, further tests are still needed to clarify the relationship between salinity exposure and plant growth and its methylation epigenetic pattern.

Keywords: Salinity. *Zea mays*. Plant epigenetics. Global methylation

1 INTRODUÇÃO

As plantas estão a todo momento expostas a esses fatores biótico e abióticos que quando atuam negativamente sobre o indivíduo causam uma reação de estresse. Tangencialmente, o estresse desempenha um papel importante na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais (FERREIRA, 2012). O estresse salino, um fator abiótico, é um dos que mais comprometem o crescimento e a produtividade das culturas em todo o mundo (VAIDYANATHAN et al., 2003; ISLÃ et al., 2010).

Em condições naturais, as plantas encontram altas concentrações de sal em costas marítimas e estuários. Na agricultura, são identificadas altas concentrações salinas em regiões propensas à seca e de solos salino, que estão sendo incorporadas progressivamente com a expansão da área agrícola cultivada no mundo (TRAJANO, 1981). Paralelamente a isso, com a demanda de irrigação, o problema da salinização secundária (após o plantio) é associado ao manejo inadequado da água e do solo e do uso de águas com elevado teor de sais, principalmente em regiões semiáridas, em que a irrigação é um importante parâmetro para a implementação da agricultura produtiva (SILVEIRA et al., 2010). No Nordeste, por exemplo, é muito comum a utilização de águas de poços comuns e tubulares na irrigação, que

segundo Medeiros et al. (2003), são mais salinas que até águas residuárias (após utilização humana).

De modo geral, a salinidade afeta tanto o crescimento como a produção das culturas de plantas, manifestando-se principalmente na redução da população e em seu desenvolvimento. A salinidade afeta o desempenho das plantas através de déficit de água, toxidez provocadas por íons, desequilíbrio nutricional (ESTEVES et al., 2008, MUNNS et al., 1986) e indiretamente, pela busca por nutrientes, mediando competições interespecíficas das espécies viventes no mesmo local (PENNINGG et al., 1992). Durante o efeito da salinidade, determinados processos são danificados, como síntese de proteínas, metabolismo de lipídios e fotossíntese. A resposta inicial do estresse salino é a redução da expansão da superfície foliar (WANG et al., 2000), ou seja, a planta diminui em altura e espessura das folhas. Este efeito promove redução nas concentrações de carboidratos - base necessária para o desenvolvimento celular.

Ainda são escassas as informações sobre o efeito da salinidade da água ou do solo na qualidade de produção, embora tais efeitos sejam aparentes (NETO BARREIRO, 2017). As respostas biológicas a alta salinidade em plantas tem sido mais discutidas quanto às características fisiológicas, moleculares e bioquímicas (MUNNS, 2005; NETO et al., 2020; NETO-BARREIRO et al., 2019).

Apesar do efeito negativo, a planta é capaz de desenvolver mecanismos de tolerância a esses estresses e completar seu ciclo de vida mesmo irrigada ou sobre um substrato com elevada concentração de sais solúveis (FLOWERS et al., 1977, GREENWAY et al., 1980). As plantas tolerantes são denominadas halófitas (FLOWERS et al. 1977), já as plantas que não conseguem desenvolver-se sobre o substrato com elevado conteúdo de sais solúveis são chamadas de glicófitas (CHEESEMAN, 1988).

As halófitas conseguem superar o estresse por causa da melhor atuação em ~~novos~~ mecanismos de tolerância, que proporcionam um manejo mais eficiente em acumular e compartimentar os solutos (ESTEVES et al., 2008). As

plantas ampliaram seus mecanismos bioquímicos e moleculares para tolerar o estresse salino através de produtos e processos alternativos (IYENGAR et al., 1996).

As estratégias bioquímicas incluem a acumulação ou exclusão seletiva de íons, controle da entrada de íons pelas raízes e transporte para as folhas, compartimentalização de íons a nível celular (vacúolos) e estrutural (folhas), síntese de osmólitos, alterações nas vias fotossintéticas, modificações na estrutura de membrana, indução de enzimas antioxidantes e hormônios (ESTEVES et al., 2008).

Esses mecanismos podem ter uma atuação simples, envolvendo alteração de algumas vias bioquímicas, ou mais complexa, envolvendo uma maior proteção do sistema respiratório e fotossintético (MUNNS, 1993), uso eficiente da água (MUNNS, 2002), manutenção da parede celular e cromossomos (BOTELLA et al., 1994).

Os fatores bióticos e abióticos apresentam importante papel durante o desenvolvimento dos organismos e resultam em possíveis mecanismos que propiciam manifestações de características provenientes da expressão gênica, sem interferir na sequência de bases da molécula de DNA (ALVES et al., 2018).

Considerando os organismos vegetais, as mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento em plantas podem desencadear a expressão diferenciada de alelos em espécies que apresentam similaridades genéticas (BANERJEE & ROYCHOUDHURY, 2017).

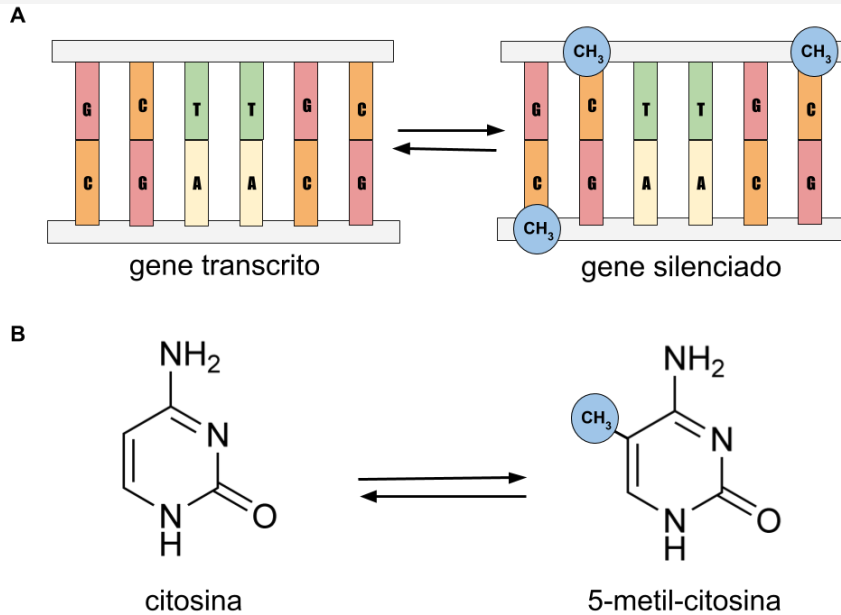
Sabe-se que as plantas, entre distintas espécies, utilizam de uma variedade de mecanismos para superar as exposições salinas (IYENGAR et al., 1996). Dessa forma, eventos sucessivos de estresse salino ao longo da vida da planta podem induzir o indivíduo a criar mecanismos de tolerância para novas exposições. Esses mecanismos se devem principalmente à regulação epigenética. A epigenética estuda as mudanças herdadas nas funções dos genes, observadas na genética, mas que não alteram as sequências de bases nucleotídicas da molécula de DNA, ou seja, modificações do genoma, herdável

durante a divisão celular, que não envolvem uma mudança na sequência do DNA. Segundo Costa et al. (2013), o epigenoma pode ser transmitido às células descendentes, mantendo um padrão de epigenótipo específico dentro de linhagens celulares durante gerações, caracterizando a “herança epigenética”.

Os padrões epigenéticos são sensíveis a modificações ambientais que podem causar mudanças fenotípicas que serão transmitidas aos descendentes (MULLER et al., 2008). As alterações epigenéticas correspondem a uma série de modificações moleculares no DNA e na cromatina (RICHARDS, 2006) e essas modificações envolvem uma série de mecanismos como: alterações nas histonas (proteínas estruturais nucleares) e padrão de metilação do DNA, que envolve modificações na estrutura das ligações covalentes do DNA (D’ALESSIO et al., 2006). Esses mecanismos atuam modificando a acessibilidade da cromatina para a regulação da transcrição.

A metilação do DNA é a principal modificação química que ocorre em eucariotos como plantas, fungos, vertebrados e invertebrados, podendo silenciar genes no processo de transcrição do DNA (KILGORE, 2007; ZILBERMAN, 2007). Esse fenômeno ocorre em áreas do DNA ricas em sequências dinucleotídicas CpG (Citosina-Guanina), chamadas de ilhas CpG, e diz respeito a adição de um grupamento metil à posição C5 do anel da citosina do DNA, catalisada por enzimas DNA metiltransferases, levando à formação de 5-metil-citosina (Figura 1) (CAIAFA et al., 2005).

Figura 1 - Estrutura esquemática do DNA metilado (A). Estrutura molecular da citosina após a ação de enzimas DNA metiltransferases (B).



Fonte: Adaptado de CAIAFA et al., 2005.

No caso de uma exposição à altas concentrações de sal, modificações epigenéticas poderão desencadear vias regulatórias para a resposta ao estresse salino, a fim de ativar genes que transcrevem produtos proteicos relacionados à resistência salina.

Atualmente, a importância dada à epigenética deve-se ao seu significado prático para a medicina, agricultura, conservação de espécies e também à maneira pela qual ela modifica nossa visão de hereditariedade e evolução. Essa regulação tem grande impacto no fenótipo do organismo, permitindo a adaptação vegetal a diferentes situações, constituindo um importante campo de estudo. Sabendo-se dos efeitos das modificações epigenéticas sobre os vegetais fica evidente a importância do entendimento desses processos para o melhoramento genético visando tolerância/adaptação a estresses.

A utilização do milho (*Zea mays*), gramínea originária da América, como espécie modelo se justifica, além da importância para a alimentação humana e popularidade, por ser muito usado como objeto de estudo de pesquisas perfazendo um montante de literatura. Especificamente para essa pesquisa, o milho é classificado como uma planta glicófita, desse modo, é certo que não

tolera altas concentrações salinas. Além disso, o milho por ser uma planta de porte médio, possui crescimento rápido, assim, em pouco tempo tem-se resultados de crescimento e biomassa para análises. Dessa forma, neste trabalho, objetivamos analisar o impacto do estresse salino no desenvolvimento de espécimes de milho e testar a influência dos tratamentos na metilação global do tecido foliar das plantas.

2 METODOLOGIA

2.1 Germinação, desenvolvimento e tratamento

As sementes de milho (*Zea mays*) IPR-164, cedidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná – Londrina (IAPAR), foram desinfetadas em solução de NaClO a 2% durante 4 minutos e depois lavadas com água deionizada. Posteriormente, foram depositadas em folhas de papel *germitest* CEL-060 previamente umedecidas com água deionizada, cobertas com uma folha de papel adicional e montados rolos que foram acondicionados em tubos de PVC escuros. A germinação ocorreu em câmara escura (Tecnal TE 400, Brasil) a 25°C. Com três dias de desenvolvimento, as plântulas em potencial foram transferidas para vasos de plástico escuro com 400 gramas de substrato vermiculita e extrato de *Pinus*.

Foram montados doze vasos, com dois indivíduos cada, e acondicionados em câmara para crescimento, a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa de 400 $\mu\text{mols de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os vasos foram irrigados a cada dois dias. Oito vasos (16 plantas) foram cultivados para controle, sendo irrigados com 60 mL de água deionizada (grupo Controle). Desses, quatro vasos (oito plantas) receberam, após dezessete dias de desenvolvimento com irrigação normal, uma aplicação concentrada de sal, de 500 μM de NaCl (grupo CT-500). Para o grupo do tratamento, quatro vasos (oito plantas) foram tratados com 100 μM de NaCl periodicamente desde o início do desenvolvimento e receberam, ao final, uma aplicação de 500 μM de

NaCl após dezessete dias de desenvolvimento (grupo T-100/500). As plantas do grupo T-100/500 receberam dose subletais e uma dose final mais intensa, a fim de verificar se uma planta exposta anteriormente a um agente estressante modificaria seu DNA epigeneticamente para superar a próxima exposição. Já as do grupo CT-500 receberam apenas uma aplicação da solução mais concentrada após serem tratados normalmente como controles durante todo o experimento, a fim de verificar se uma exposição abrupta levaria à alguma alteração na metilação global. A germinação e crescimento das plantas nesse esquema experimental foi realizada duas vezes: uma para a obtenção dos parâmetros biométricos e outra para obtenção do DNA genômico dos grupos de plantas. Essa replicação ocorreu devido à demanda de parte do material biológico das folhas para obtenção do DNA, o que afetaria sua disponibilidade total para a biometria. Para garantir que o material suficiente para as duas etapas, o experimento foi replicado.

2.2 Parâmetros biométricos

No 27º dia de incubação, as plantas de milho foram retiradas do sistema experimental para a realização dos parâmetros biométricos: comprimento das folhas e colmos (com fita métrica simples), biomassa fresca e biomassa seca (com balança de precisão). Para a realização das medidas das folhas, foi escolhida a última folha expandida com lígula definida (STICKLER, et al., 1961). O material foi colocado em estufa a 60°C para secagem, por aproximadamente 4 dias, procedendo-se a partir de então a determinação da massa seca.

2.3 Obtenção do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir da folha dos indivíduos dos grupos Controle, CT-500 e T-100/500, seguindo a metodologia de Dellaporta et al.

(1983) e Mühlen (1999). Foi quantificado e avaliado quanto à sua pureza pelo espectrofotômetro Nanodrop® (razão A260/280 e A260/230nm). Os mesmos intervalos temporais dos parâmetros biométricos foram obedecidos. Foi macerado cerca 500 mg de material vegetal fresco em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz de porcelana previamente congelado. O DNA genômico total obtido foi ressuspenso em 200 uL de tampão Tris-EDTA com RNase na concentração final de 40 µg/mL. A concentração do DNA (em ng/uL) foi estimada por espectrofotometria a 260nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop®.

2.6 Testes para medidas da metilação global do DNA

A quantificação relativa dos níveis globais de metilação do DNA foi obtida com um teste de ensaio colorimétrico utilizando um kit comercialmente disponível, o MDQ1 (ImprintMethylated DNA Kit de quantificação, Sigma Aldrich). Foram testadas quatro amostras de DNA das plantas do controle, quatro amostras de DNA das plantas tratadas com aplicação única de 500µM de NaCl (CT-500) e quatro amostras de DNA das plantas tratadas com 100µM de NaCl (T-100/500). O DNA metilado foi detectado utilizando anticorpos e reagentes com alta especificidade a 5 metil-citosina (5mC) e depois quantificados colorimetricamente. A absorbância foi lida a 450 nm com o espectrofotômetro Nanodrop®. A porcentagem de metilação do DNA foi calculada em relação ao padrão interno de controle do DNA metilado fornecido no kit e de acordo com o protocolo do fabricante. O cálculo foi baseado na porcentagem de metilação das amostras testadas (CT-500 E T-100/500) em relação ao DNA controle de metilação fornecido pelo kit.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar os parâmetros biométricos, vê-se que as plantas do grupo de controle, que não foram submetidas ao tratamento, apresentaram um

desenvolvimento dentro do esperado, com médias de altura e biomassa fresca e seca mais altas que as demais plantas dos outros grupos, como demonstrado na Tabela 1. As plantas do grupo CT-500 apresentaram baixas no desenvolvimento, com médias de altura e biomassa fresca e seca menores que o controle, com uma diferença de respectivamente 13,50 cm, 3,29 g e 0,23 g. Por conseguinte, as do T-100/500 apresentaram pior desenvolvimento, com médias de altura e biomassa fresca e seca menores, quantificando uma diferença de 32,30 cm, 10,36 g e 0,72 g respectivamente do grupo de controle, como mostra a Tabela 1. Ou seja, em relação às plantas controle, as plantas do grupo CT-500 reduziram o crescimento em 18,3%, a biomassa fresca em 23,6% e a biomassa seca em 30,8%. Já as do T-100/500 reduziram o crescimento em 44,4%, a biomassa fresca em 74,3% e a biomassa seca em 69,2%.

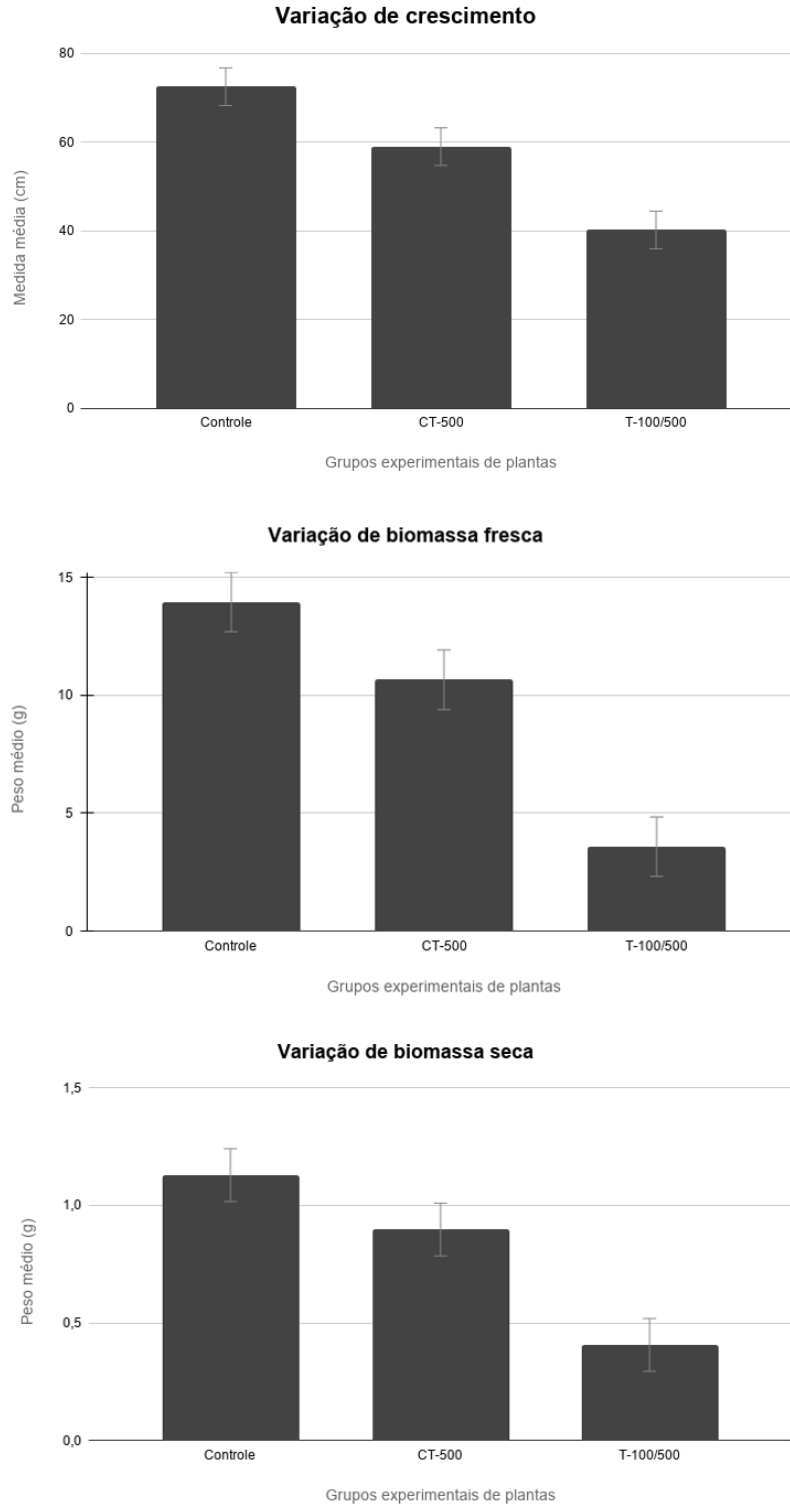
Tabela 1 - Comparação dos parâmetros biométricos (médias e desvios-padrão) entre os grupos experimentais de controle não tratado com NaCl, tratados uma vez com 500µM de NaCl e tratados com 100µM de NaCl.

Grupos de plantas	Medida média (cm)	Biomassa fresca média (g)	Biomassa seca média (g)
Controle	72,55 ± 3,1468	13,9523±2,1851	1,1295±0,179
CT-500	59,05 ± 4,0530	10,6563±0,8279	0,8981±0,096
T-100/500	40,25 ± 5,5245	3,5846±0,7687	0,40695±0,0619

Fonte: as autoras.

Pode-se observar graficamente a redução dos parâmetros biométricos em efeito ao tratamento na Figura 2.

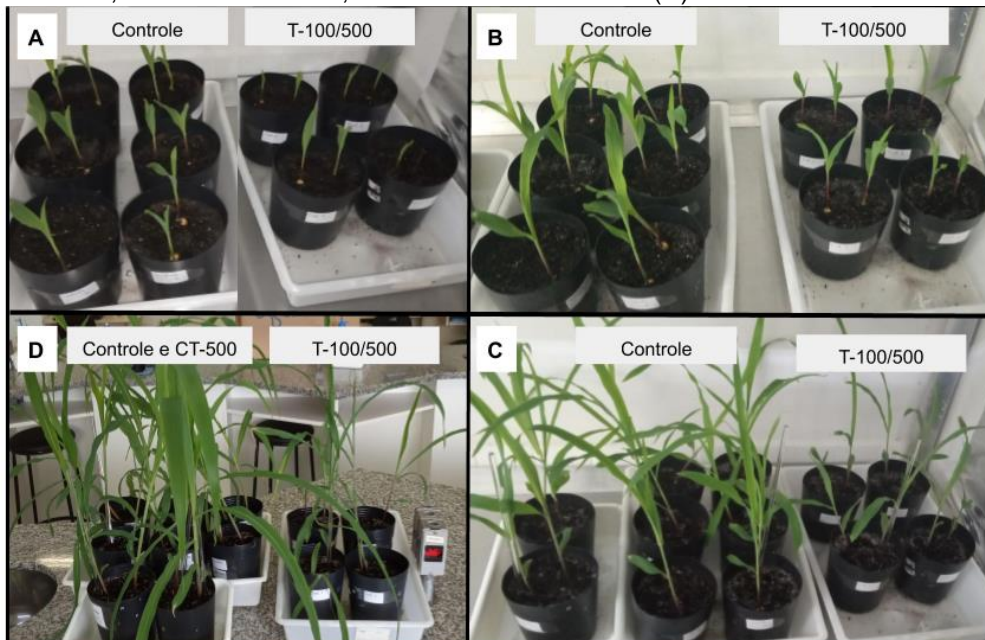
Figura 2 - Gráficos de variação dos parâmetros biométricos - crescimento (A), biomassa fresca (B) e biomassa seca (C) - entre os grupos experimentais de controle, CT-500 e T-100/500.



Fonte: as autoras.

Ao longo do crescimento já foi possível observar diferenças de desenvolvimento entre os grupos. É possível observar os estágios do desenvolvimento na Figura 3.

Figura 3 - Plantas no dia da segunda irrigação após sete dias de desenvolvimento (A). Plantas no dia da terceira irrigação após nove dias de desenvolvimento (B). Plantas no dia da quarta irrigação após quatorze dias de desenvolvimento (C). Plantas no dia da medida dos parâmetros biométricos após vinte e sete dias de desenvolvimento. Observa-se as plantas do controle e CT-500 com mais folhas, folhas maiores e mais espessas e as do T-100/500, menos desenvolvidas, com menos folhas, menores e mais afiladas (D).



Fonte: as autoras.

Resultado similar ao obtido foi observado por Oliveira et al. (2009), com exposição de milho-pipoca a salinização por irrigação, que demonstraram significativos efeitos negativos da salinidade. Redução do parâmetro de altura das plantas em resposta a salinidade também foi encontrada para a cultura do milho comum em feijoeiro (TRAJANO, 1981), no algodoeiro (JÁCOME et al., 2003), e em outras culturas.

Em plantas de arroz, Campos et al. (1989) observaram reduções bastante significativas na matéria seca total em efeito ao cloreto de sódio, e que o crescimento das plantas foi afetado pelo fechamento precoce dos estômatos.

Izzo et al. (1993) demonstraram que a redução do crescimento de plantas de milho em condições de estresse salino está associada a uma redução do potencial osmótico da planta o que indica um ajustamento osmótico decorrente da síntese de solutos compatíveis.

A redução nas características avaliadas nesta pesquisa, baseando-se na pesquisa de Oliveira et al. (2009), se deve possivelmente a diminuição do potencial osmótico que dificulta a absorção de água pelas plantas.

Nesta pesquisa, foram testados apenas os efeitos da salinidade na porção aérea das plantas de milho, mas, segundo Morales et al. (2001), nem todas as partes da planta são igualmente afetadas pela salinidade. Por exemplo, na pesquisa supracitada de Oliveira et al. (2009), o sistema radicular foi mais sensível à salinidade do que a parte aérea da planta. Neto et al. (1999) observou em seu estudo que o estresse salino provoca o aumento na alocação da biomassa das raízes objetivando aumentar a capacidade de absorção de nutrientes. Esse comportamento é observado por Rebouças et al. (1989) em cultivares de algodão. Em contraposição, O'leary (1975) relata uma redução no peso da matéria fresca das raízes em função do aumento da salinidade em plantas de feijão e Johnson (1991) não observa diferenças significativas entre o peso da matéria seca da raiz de genótipos de trigo em estresse salino.

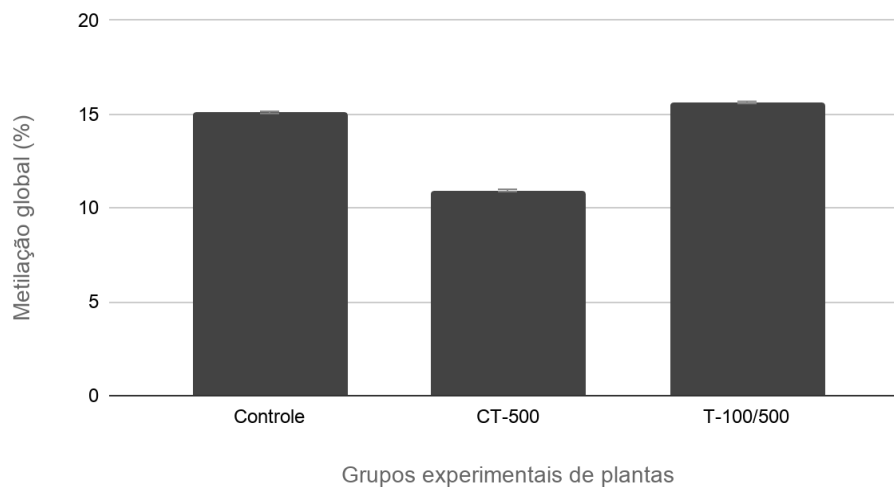
3.2 Extração do DNA genômico

O DNA genômico extraído das plantas apresentou alta quantificação (611,4 ng/uL a 1234,9 ng/uL) para todos os grupos de indivíduos, bem como um alto grau de pureza - dentro do padrão próximo de 1,9 (razão A260/230) e dentro do parâmetro de salinidade (razão A 280/260).

3.3 Mensuração da metilação global

Analisando os resultados obtidos com esse experimento, não se observou diferença significativa da porcentagem de metilação global entre o grupo controle e T-100/500 (controle: 15,10%; T-100/500: 15,63%), somente o CT-500 apresentou menor porcentagem de metilação (10,94%) (Figura 4). Os controles positivo e negativo da reação apresentaram resultados de acordo com o esperado pelas instruções do fabricante, validando o experimento.

Figura 4 - Variação de porcentagem de metilação global entre os grupos experimentais de controle, CT-500 e T-100/500.



Fonte: as autoras.

Segundo Eichten et al. (2015), hipoteticamente, um estresse específico, como a exposição à salinidade, resultaria consistentemente em alterações específicas no padrão de metilação. Há evidências de que isso ocorre na cultura de tecidos tanto no arroz (STROUD et al., 2013) e inclusive no milho (STELPFLUG et al., 2014).

Embora fosse esperado que as plantas do grupo T-100/500 tivessem alguma variação significativa no padrão de metilação do DNA em relação às plantas controle, essa variação foi observada apenas nas do CT-500. Algumas hipóteses podem ser levantadas para a observação desse resultado, discutidas a seguir.

As plantas do CT-500 tiveram uma mudança abrupta no seu meio, o que pode ter causado uma reação ao estresse podendo se relacionar com a sua diminuição da metilação global. Ao invés das do T-100/500 que, mesmo com a aplicação periódica da solução salina, não apresentaram alguma variação epigenética relevante.

Um resultado inconsistente como esse é observado na pesquisa de Eichten et al. (2015), também com plantas de milho, em que não foram encontradas evidências de alterações consistentes na metilação do DNA dos tratamentos de estresse induzido de frio, calor e UV em relação ao controle.

Os resultados da pesquisa de Eichten et al. (2015) e desta pesquisa sugerem a hipótese de metilações e desmetilações em genes diversos (variação estocástica). Em outras palavras, as tensões ambientais podem resultar no aumento desse fenômeno nos padrões de metilação do DNA (EICHTEN et al., 2015).

Ainda são limitados os testes para confirmar essa hipótese, mas na pesquisa de Eichten et al. (2015) concluiu-se que houve uma baixa taxa de variação estocástica nas plantas de controle e estressadas. No estudo de Jiang et al. (2014) também são encontradas alterações pequenas na taxa de epimutação e mutação em plantas de *Arabidopsis thaliana* sujeitas à estresse abiótico.

Além disso, o teste de metilação foi feito para somente 4 amostras de DNA de cada grupo experimental (um total de 12 amostras de DNA), o que aumentou a aleatoriedade dos resultados e diminuiu a robustez estatística do experimento específico.

Ademais, o DNA genômico foi obtido a partir das folhas das plantas de milho foi usado para os testes de metilação, quando alterações na metilação do

milho já demonstraram poder ser tecido-específicas. Segundo Zhang et al. (2011) existem alterações epigenéticas que acontecem em alguns tecidos específicos das plantas, como na raiz ou caule, por exemplo. Na pesquisa de Oliveira et al. (2009), citado anteriormente, o sistema radicular foi mais sensível à salinidade do que a parte aérea da planta.

Dessa forma, para entender de forma mais ampla a atuação da epigenética nesse cenário, seria necessário aplicar testes adicionais, tais como: ampliar o maior número de indivíduos testados, extrair DNA de outras partes das plantas para verificar a hipótese sugerida de alterações tecido-específicas, e testar novamente a exposição abrupta, com diferentes concentrações de sais, uma vez que houve indícios que esse tipo de exposição apresentou maior variação nos padrões de metilação.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dessa pesquisa apontam para uma clara influência negativa do estresse salino no desenvolvimento do milho, como observado pela análise biométrica. As plantas do grupo T-100/500 apresentaram pior desenvolvimento, as do CT-500 apresentaram redução no desenvolvimento e as cultivadas para controle apresentaram um desenvolvimento dentro do esperado. As análises moleculares apontaram indícios de alterações epigenéticas após estresse salino nesse modelo experimental, mas o padrão descrito necessita de testes adicionais para ser melhor compreendido, como aumento no número de indivíduos nos experimentos e testes tecido-específicos, considerando especialmente a raiz das plantas.

REFERÊNCIAS

CAIAFA, P.; ZAMPIERI, M. **DNA methylation and chromatin structure: The puzzling CpG islands.** Journal of Cellular Biochemistry, v.94, n.2, p.257-265, 2005

CAMPOS, I. S.; FERREIRA, L. G. R.; ASSUNÇÃO, M. V. **Efeitos salinos no crescimento e desenvolvimento do arroz: alterações fisiológicas.** Pesq. Agrop. Bras., v.24, p.1111-1118, 1989.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J; HICKS, J. B. **A plant DNA minipreparation: version II.** Plant Molecular Biology Report. v. 1, p. 19-21, 1983.

EICHTEN, Steven R; SPRINGER, Nathan M. **Minimal evidence for consistent changes in maize DNA methylation patterns following environmental stress.** Frontiers in plant science, 2015. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00308/full#B15>>
Acessado em: 10 abr. 2015.

ESTEVES, Bruno dos Santos; SUZUKI, Marina Satika. **Efeito da salinidade sobre as plantas.** Oecologia Brasiliensis, v. 12, n. 4, p. 6, 2008.

FERREIRA, Daiane de Moura. **Resposta do Vegetal ao Estresse.** Universidade Do Estado Da Bahia – UNEB: Departamento de Educação Campus VIII - Licenciatura em Ciências Biológicas, 2012.

FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. **The mechanism of salt tolerance in halophytes.** Annual review of plant physiology, v. 28, n. 1, p. 89-121, 1977.

GREENWAY, H.; MUNNS, Rana. **Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes.** Annual review of plant physiology, v. 31, n. 1, p. 149-190, 1980.

ISLÃ, R, ARAGUÉS, R. **Yield and plant ion concentrations in maize (Zeamays L.) subject to diurnal and nocturnal saline sprinkler irrigations.** Field Crops Research, 2010.

IYENGAR, E. R. R.; REDDY, M. P. **Photosynthesis in highly salt tolerant plants.** Handbook of photosynthesis. Marshal Dekar, Baten Rose, USA, v. 909, 1996.

IZZO, R.; NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, F. **Growth and mineral absorption in maize seedlings as affected by increasing NaCl concentrations.** Journal of Plant Nutrition, v.14, n.7, p.687- 699, 1991

JÁCOME, A.G.; OLIVEIRA, R.H.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; SOUZA, A.P.; GONÇALVES, A.C.A. **Crescimento de genótipos de algodoeiro em função da salinidade da água de irrigação.** Acta Scientiarum. Agronomy, v. 25, n.2, p.305- 313, 2003.

JIANG, C.; MITHANI, A.; BELFIELD, E. J.; MOTT, R.; HURST, L. D.; HARBERD, N. P. **Environmentally responsive genome-wide accumulation of de novo Arabidopsis thaliana mutations and epimutations.** Genome, 2014. Disponível em:

<<http://genome.cshlp.org:4040/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=25314969>>

Acessado em: 10 abr. 2020.

JOHNSON, R. C. **Salinity resistance, water relations, and salt content of crested and tall wheatgrass accessions.** Crop Science, v.31, p.730-734, 1991.

KILGORE, J. A.; HOOSE, S. A.; GUSTAFSON, T. L.; PORTER, W.; KLADDE, M. P. **Single-molecule and population probing of chromatin structure using DNA methyltransferases.** Methods, Bethesda, v. 41, n.3, p. 320-332, 2007.

MEDEIROS, J.F. de; LISBOA, R. de A.; SILVA JUNIOR, M.J. da. **Caracterização das águas subterrâneas usadas para irrigação na área produtora de melão na Chapada do Apodi.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande, v.7, n.3, p.469-472, 2003.

MORALES, M.A.; OLMOS, E.; TORRECILLAS, A.; ALARCON, J.J. **Differences in water relations, leaf ion accumulation and excretion rates between cultivated and wild species of Limonium sp. grown in conditions of saline stress.** Flora, v.196, n.5, p.345-352, 2001.

MÜHLEN, G. S. **Avaliação da diversidade genética de etnovarietades de mandioca (Manihot esculenta Crantz) com marcadores de DNA: RAPD, AFLP e Microssatélites.** 1999. 176 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba.

MUNNS, Rana; TERMAAT, Annie. **Whole-plant responses to salinity.** Functional Plant Biology, v. 13, n. 1, p. 143-160, 1986.

MUNNS, Rana. **Comparative physiology of salt and water stress.** Plant, cell & environment, v. 25, n. 2, p. 239-250, 2002.

MUNNS, Rana. **Genes and salt tolerance: bringing them together.** New phytologist, v. 167, n. 3, p. 645-663, 2005.

MUNNS, Rana. **Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses.** Plant, Cell & Environment, v. 16, n. 1, p. 15-24, 1993.

NETO, Egídio Bezerra; NOGUEIRA, Rejane Jurema Mansur Custódio. **Estudo comparativo do crescimento de plantas de tomate e milho sob condições de salinidade.** Scielo: Braz. arch. biol. technol. v.42, Curitiba, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89131999000400013> Acessado em: 15 abr. 2020.

NETO BARREIRO, Miguel et al. **Influência da salinidade da água de irrigação na produção e qualidade de frutos em genótipos de abacaxizeiro.** Revista de Tecnologia & Ciências Agropecuárias. João Pessoa, v.11, n.6, p.71-79, dez. 2017. Disponível em: <http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-11-2017/v-11-n-6-dezembro-2017/10-artigo-ce-0917-02-influencia-da-salinidade-da-agua-de-irrigacao.pdf>>. Acessado em: 28 abr. 2019.

O'LEARY, J. W. **Hight humidity overcomes lethal levels of salinity in hydroponically grown salt-sensitive plants.** Plant and Soil, v.42, p.717-721, 1975.

OLIVEIRA, Francisco de A. de; MEDEIROS, José F. de; OLIVEIRA, Mychelle K. T. de; LIMA, Carlos J. G. de S.; ALMEIDA JUNIOR, Agenor B. de; AMÂNCIO, Maria das G. **Desenvolvimento inicial do milho-pipoca irrigado com água de diferentes níveis de salinidade.** Agrária: Revista Brasileira de Ciências Agrárias v.4, n.2, p.149-155, 2009. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/1190/119017351005.pdf>> Acessado em: 10 abr. 2020.

PENNINGS, Steven C.; CALLAWAY, Ragan M. **Salt marsh plant zonation: the relative importance of competition and physical factors.** Ecology, v. 73, n. 2, p. 681-690, 1992.

REBOUÇAS, M.A.A.; FAÇANHA, J.G.V.; FERREIRA, L.G.R.; PRISCO, J.T. **Crescimento e conteúdo de N, P, K e Na em três cultivares de algodão sob condições de estresse salino.** Rev. Bras. Fisiol. Vegetal, v.1, p.79-85, 1989.

RICHARDS, E. J. **Inherited epigenetic variation: revisiting soft inheritance.** Nature Reviews:Genetics, London, v. 7, p. 395-401, 2006.

SILVEIRA, Joaquim AG et al. **Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas.** Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados, v. 1, p. 161-18, 2010.

STELPFLUG, S. C.; EICHTEN, S. R.; HERMANSON, P. J.; SPRINGER, N. M.; KAEPLER, S. M. **Consistent and heritable alterations of DNA methylation are induced by tissue culture in maize.** Genetics, 2014. Disponível em: <<https://www.genetics.org/content/198/1/209.long>> Acessado em: 10 abr. 2020.

STICKLER, F.M.; WERDEN, S.; PAULI, A.W. **Leaf area determination in grain sorghum.** Agronomy Journal, v.53, p. 197-188, 1961.

STROUD, H.; DING, B.; SIMON, S. A.; FENG, S.; BELLIZZI, M.; PELLEGRINI, M.; et al. **Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice.** eLife Sciences, 2013. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/00354>> Acessado em: 10 abr. 2020.

TRAJANO, M.D.M. **Acúmulo de sais no solo e comportamento de algumas plantas tratadas com água salina.** Areia: Universidade Federal da Paraíba, 1981.

VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARTY, R.; THOMAS, G. **Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) – differential response in salt-tolerant and sensitive varieties.** Plant Science, 2003.

WANG, Y.; NII, N. **Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress.** The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, v. 75, n. 6, p. 623-627, 2000.

ZHANG, X.; SHENG, J.; LI, F.; MENGA, D. E SHEN, L. **Methyl jasmonate alters arginine catabolism and improves postharvest chilling tolerance in cherry tomato fruit.** Postharvest Biology and Technology, v.64, n.1, p.160–16, 2012.

ZILBERMAN, D. **Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA.**
Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 34, n. 2, p. 125-136,
2013.

Enviado em: 09/10/2020

Aceito em: 28/12/2022

Editor Chefe: Prof. Dr. Everaldo dos Santos

Editor Adjunto: Dr. Wilian Demetrio

