

MARIA JAISLANNY LACERDA E MEDEIROS

**AÇÃO DA PROLINA EXÓGENA NO CULTIVO *IN VITRO* DE
GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDOS AO ESTRESSE
SALINO**

**RECIFE
2010**

MARIA JAISLANNY LACERDA E MEDEIROS

**AÇÃO DA PROLINA EXÓGENA NO CULTIVO *IN VITRO* DE GENÓTIPOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDOS AO ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas.

Orientadora: DSc. Lilia Gomes Willadino

Professora do Departamento de Biologia-UFRPE

Co-Orientador: DSc. Gilberto de Souza e Silva Junior

Professor do Instituto Federal de Pernambuco-IFPE

RECIFE-PE
Fevereiro - 2010

**AÇÃO DA PROLINA EXÓGENA NO CULTIVO *IN VITRO* DE GENÓTIPOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDOS AO ESTRESSE SALINO**

MARIA JAISLANNY LACERDA E MEDEIROS

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ___/___/___

ORIENTADORA:

DSc. Lilia Gomes Willadino
Professora do Departamento de Biologia-UFRPE

EXAMINADORES:

DSc. Terezinha Rangel Camara
Professora do Departamento de Química-UFRPE

DSc. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Professora do Departamento de Morfologia e
Fisiologia Animal-UFRPE

DSc. Reginaldo de Carvalho
Professora do Departamento de Biologia-UFRPE

“Nós, cientistas, acreditamos que o que nós e nossos semelhantes fizermos ou deixarmos de fazer nos próximos anos determinará o destino de nossa civilização. E consideramos nossa tarefa explicar incansavelmente essa verdade, ajudar as pessoas a perceber tudo o que está em jogo, e trabalhar, não para contemporizar, mas para aumentar o entendimento e conseguir, finalmente, a harmonia entre os povos e nações de diferentes pontos de vista”.

Albert Einstein

*Aos meus pais, irmãos e sobrinhos,
aos meus familiares e amigos, que
sempre acreditaram em mim...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, Pai e amigo incondicional, por compreender-me em todas as minhas dificuldades e por permitir-me tantos aprendizados durante o convívio com todos aqui citados;

Aos meus pais, JANILDO e AUREOLINA, meu pleno agradecimento pelo apoio, incentivo, exemplo... Enfim, por tudo o que eu construí até hoje;

Aos meus irmãos CLETSON, JANNIELY e JUNINHO, e aos meus sobrinhos, JÚLIO CÉSAR, VICTOR e ANNA JÚLIA, sempre presentes, mesmo que distantes;

Ao meu amado EDUARDO, pelo amor, companheirismo, compreensão, apoio e principalmente pela paciência por quase dois anos;

Aos TIOS e PRIMOS recifenses, que acolheram-me com muito amor;

As amigas piancoenses MARKLITÂNIA, KARLA, SUSU, IZINHA e CREUZA, que fazem parte da minha vida e, mesmo que distantes, sempre me incentivaram de alguma forma. Obrigada por nunca me deixarem esquecer que a amizade é o sentimento mais nobre que existe;

As minhas eternas amigas MARINA, companheira de Graduação, Mestrado e futuramente de Doutorado, e a SILVANY pela convivência, paciência, vitórias, por todos os passos que demos juntas e principalmente por terem aguentado meus abusos durante esses dois anos;

Ao Titio ROMERO, pelo apoio e amizade, iniciada na faculdade e consolidada no mestrado;

À minha orientadora LILIA WILLADINO, pela tranquilidade, confiança, incentivo, sabedoria, compreensão e amizade, fundamentais para a minha formação acadêmica e pessoal;

Ao meu co-orientador GILBERTO, pelos valiosos ensinamentos;

À professora TEREZINHA, por toda a sua alegria, amizade, sugestões e apoio durante a execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais: LU, MANU, RONALDO, VITOR, JOÃO e em especial a FRICKWELL pelas boas conversas, amizade e apoio nas análises enzimáticas;

À UFRPE, aos PROFESSORES e colegas (EVA, RÔMULO, JOÃO, JACK, BEL, JÚLIO e PAULA) do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Melhoramento Genética de Plantas) pela importante contribuição no aperfeiçoamento de minha formação profissional;

À BERNADETE, pela valiosa ajuda;

Aos membros da Banca Examinadora (TEREZINHA, ANA PORTO, REGINALDO e CLÁUDIA-suplente) por aceitarem o convite de participação na Defesa de Dissertação;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa;

Ao CETENE, pelo fornecimento das plantas de cana-de-açúcar;

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

RESUMO

A cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícola no cenário econômico e social brasileiro e sua manutenção, bem como o aumento de produção e produtividade está ligado ao melhoramento genético com seleção de novos genótipos que apresentem características de interesse agrônomo. As técnicas de cultura de tecidos podem ser utilizadas em estudos de seleção ou avaliação da tolerância de plantas contribuindo no esclarecimento das alterações provenientes das condições de estresse. A produtividade da cana-de-açúcar sofre influência de diversos fatores ambientais como a salinidade que limita a produção devido aos efeitos osmóticos e de toxicidade iônica pela absorção de Na^+ e Cl^- . O estresse salino aumenta a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo promover estresse oxidativo e provocar injúrias aos lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA. Para minimizar os danos causados pelo acúmulo de ROS, as plantas possuem o sistema antioxidativo de defesa que envolve substâncias de natureza enzimática (catalase-CAT, peroxidase-POD, ascorbato peroxidase-APX e polifenoloxidase-PPO) e não enzimática como a prolina. Os objetivos desse estudo foram avaliar a ação de prolina exógena no cultivo *in vitro* de genótipos de cana-de-açúcar submetidos ao estresse salino e analisar as alterações bioquímicas que ocorrem nessas condições. Foram utilizadas plantas micropropagadas dos genótipos RB931011 e RB872552. As plantas foram cultivadas, durante 20 dias, na ausência ou presença de 20 mM de prolina associada ou não a 100 mM de NaCl, totalizando cinco tratamentos. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com fatorial 2x5 (genótipo x tratamento). Amostras de folhas foram coletadas procedendo-se análises dos teores de prolina endógena e proteínas solúveis totais, porcentagem de extravasamento de eletrólitos, concentração dos íons Na^+ e K^+ e atividade das enzimas CAT, POD, APX e PPO. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nos tratamentos salinos, ambos os genótipos apresentaram aumento no extravasamento de eletrólitos, causado, possivelmente, pela peroxidação lipídica. As plantas cultivadas sob estresse salino apresentaram redução no teor de proteínas solúveis totais e paralelamente ocorreu uma manutenção ou acréscimo no teor de prolina endógena. O sal também promoveu o aumento na concentração de Na^+ e diminuição de K^+ gerando, conseqüentemente, uma elevada relação Na^+/K^+ . A atividade das enzimas CAT, POD, APX e PPO, responsáveis pela eliminação de ROS, aumentaram em função da salinidade em ambos os genótipos. O genótipo RB931011 apresentou uma maior aclimação ao estresse salino quando comparado ao genótipo RB872552 devido ao maior aumento do teor de prolina endógena e maior atividade das enzimas antioxidantes o que resultou em um menor dano de membrana.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum* L., ROS, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Sugarcane is one of the main agricultural products in the economic and social scenario Brazilian and maintenance, as well as increased production and productivity is linked to genetic improvement with selection of new genotypes that have the characteristics of agronomic interest. The techniques of tissue culture can be used in studies of selection or evaluation of the tolerance of plants contributing to clarify the changes from the conditions of stress. The productivity of sugarcane is influenced by several environmental factors such as salinity that limits production due to osmotic effects and ion toxicity by absorption of Na^+ and Cl^- . Salt stress increase the concentration of reactive oxygen species (ROS), may promote oxidative stress and cause injury to lipids, proteins, carbohydrates and DNA. To minimize the damage caused by the accumulation of ROS, plants possess the antioxidant defense system involving substances of nature enzyme (catalase-CAT, peroxidase-POD, ascorbate peroxidase-APX and polyphenoloxidase, PPO) and not enzyme as the proline. The objectives of this study were to evaluate the effects of exogenous proline in cultivation *in vitro* of sugarcane submitted to salt stress and analyze the biochemical changes that occur in these conditions. Plants were micropropagated genotypes RB931011 and RB872552. Plants were grown, for 20 days, in the absence or presence of 20 mM proline with or without 100 mM NaCl, totaling five treatments. We used a completely randomized design with 2x5 factorial (genotype x treatment). Leaf samples were collected proceeding to analysis of endogenous levels of proline and total soluble proteins, percentage of electrolyte leakage, concentration of Na^+ and K^+ and activity of enzymes CAT, POD, APX and PPO. The data were analyzed using ANOVA and means compared by Tukey test at 5% probability. In the saline treatments, both genotypes showed an increase in electrolyte leakage, caused possibly, by lipid peroxidation. Plants grown under salt stress showed a reduced content of total soluble protein and in parallel maintenance or increase in the endogenous proline content. The salt also promoted the increase in the concentration of Na^+ and decreased K^+ generating thus a high ratio Na^+/K^+ . The activity of CAT, POD, APX and PPO, responsible for the elimination of ROS, increased with increasing salinity in both genotypes. The RB931011 genotype had a greater acclimation compared to genotype RB872552 due to the largest increase in endogenous proline content and increased activity of antioxidant enzymes resulting in minor membrane damage.

Key words: *Saccharum officinarum* L., ROS, oxidative stress, antioxidant enzymes.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

ROS – Reactive Oxygen Species

NaCl - cloreto de sódio

K⁺ - potássio

Ca²⁺ - cálcio

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

O₂^{•-} - radical superóxido

OH[•] - radical hidroxila

HO₂[•] - radical hidroperóxido

¹O₂ - oxigênio singleto

SOD (EC 1.15.1.1) - superóxido dismutase

APX (EC 1.11.1.11) - ascorbato peroxidase

GR (EC 1.6.4.2) - glutathiona redutase

CAT (EC 1.11.1.6) - catalase

PPO (EC 1.14.18.1) - polifenoloxidase

POD (EC 1.11.1.7) - peroxidase

P5CS - pirrolina-5-carboxilato sintase

P5CR - pirrolina-5-carboxilato redutase

PDH - prolina desidrogenase

P5CDH - pirrolina-5-carboxilato desidrogenase

BAP - 6-benzil aminopurina

Pro - prolina

PIA - porcentagem de integridade absoluta da membrana

SIT – Sistema de Imersão Temporária

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Percepção de sinais externos e resposta da planta ao estresse salino 20
- Figura 2.** Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo. (Adaptado de COHEN, 1989). 21
- Figura 3.** Representação das reações de síntese e degradação da prolina. P5CS: pirrolina-5-carboxilato sintase; P5CR: pirrolina-5-carboxilato redutase; P5CDH: pirrolina-5-carboxilato desidrogenase; PDH: prolina desidrogenase (Adaptado de VERBRUGGEN e HERMANS, 2008). 27

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Porcentagem de integridade absoluta de membrana em dois genótipos de cana-de-açúcar micripropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais, no mesmo genótipo, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 47
- Figura 2.** Teores endógenos de prolina em dois genótipos de cana-de-açúcar micripropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo, e minúsculas, no mesmo tratamento, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 48
- Figura 3.** Teores de proteínas solúveis totais em dois genótipos de cana-de-açúcar micripropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo, e minúsculas, no mesmo tratamento, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 50
- Figura 4.** Mudanças nas concentrações de A- Na^+ e B- K^+ em dois genótipos de cana-de-açúcar micripropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 51
- Figura 5.** Mudanças na relação Na^+/K^+ em dois genótipos de cana-de-açúcar micripropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 52

Figura 6. A- Atividade da CAT e B- Atividade da POD em dois genótipos de cana-de-açúcar micropropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo, e minúsculas, no mesmo tratamento, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 54

Figura 7. A- Atividade da APX e B- Atividade da PPO em dois genótipos de cana-de-açúcar micropropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo, e minúsculas, no mesmo tratamento, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 56

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	13
1. ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA AGROINDUSTRIAL DA CANA-DE-AÇÚCAR	14
2. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	15
3. ESTRESSE	16
3.1 Estresse salino	17
3.2 Estresse Oxidativo	20
4. SISTEMA ANTIOXIDATIVO DE DEFESA	22
4.1 Enzimas	24
4.2 Osmoprotetores	25
5. PROLINA	26
5.1 Síntese e Degradação	27
5.2 Mecanismos de acumulação de prolina induzidos por estresse	28
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO II - AÇÃO DA PROLINA EXÓGENA EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> SOB ESTRESSE SALINO	39
RESUMO	41
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
1. Material vegetal e tratamentos de estresse	43
2. Determinação dos teores de prolina, proteínas solúveis totais e extravasamento de eletrólitos	44
3. Determinação dos teores de Na ⁺ e K ⁺	45
4. Análises enzimáticas	45
5. Análises estatísticas	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
AGRADECIMENTOS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CONCLUSÕES GERAIS	65
ANEXO - INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO A REVISTA SCIENTIA AGRICOLA	67

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1. ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA AGROINDUSTRIAL DA CANA-DE-AÇÚCAR

Monocotiledônea de ciclo semi-perene, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) pertence à Divisão Magnoliophyta, Classe Liliopsida, Família Poaceae e ao Gênero *Saccharum*. É originária do Sudeste Asiático, na grande região central da Nova Guiné e Indonésia (SACIOTO, 2003).

A cana-de-açúcar desenvolve-se em forma de touceira com a parte aérea, formada por colmos, folhas e inflorescências, e a parte subterrânea formada de raízes e rizomas. O colmo, constituído por nódios e internódios, é a parte que fica acima do solo, sustentando as folhas e a panícula. As raízes são fasciculadas e os rizomas possuem nódios, internódios e gemas, responsáveis pelo aparecimento dos perfilhos, formados na touceira. A folha é ligada ao colmo, na região nodal, formando duas fileiras opostas e alternadas. A inflorescência é uma panícula aberta e a flor é hermafrodita, possuindo ovário, com um ovúlo, e três estames que sustentam as anteras com os grãos de pólen. O fruto, como na maioria das gramíneas, é uma cariopse de forma elíptica alongada (CESNIK e MIOCQUE, 2004).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Atualmente, o setor sucroalcooleiro passa por um acelerado processo de crescimento devido à escassez das reservas de petróleo e à preocupação da sociedade com as iminentes mudanças climáticas (DEDEMO, 2006). Na safra 2008/2009 a cultura ocupou mais de 7 milhões de hectares e atingiu a produção de 571,4 milhões de toneladas, contribuindo com cerca de um terço da produção mundial (CONAB, 2009). No Nordeste, ocupou 1,05 milhões de hectares e produziu 64,4 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Nessa Safra, a agroindústria canavieira ocupou, em Pernambuco, uma área de 321,4 mil hectares com uma produção de 19,1 milhões de toneladas, gerando cerca de 120 mil empregos diretos, nas áreas rural e industrial (CONAB, 2009).

Do processo de industrialização da cana-de-açúcar obtêm-se produtos como açúcar, etanol e aguardente. A indústria canavieira brasileira mantém o maior sistema de produção de energia comercial de biomassa no mundo através do etanol e do uso quase total do bagaço. Souza e Silva (2002) afirmam que existe a perspectiva de se utilizar a cana-de-açúcar como biorreator na geração de energia elétrica, bem como na produção de plásticos biodegradáveis, açúcares não calóricos

e compostos químicos de interesse farmacêutico. O cultivo de cana-de-açúcar é responsável pela geração de muitos empregos diretos e indiretos, o que evidencia sua importância econômica e social (SACILOTO, 2003).

A cana-de-açúcar é um dos principais produtos no cenário econômico e social brasileiro e o sucesso desse agronegócio está ligado ao melhoramento genético com seleção de novas variedades, obtidas por meio de programas de melhoramento desenvolvidos pelos centros de pesquisa e estações experimentais (VETTORE et al., 2001). Conforme Barbosa et al. (2002), o melhoramento genético foi fundamental para o desenvolvimento do setor canavieiro nacional, propiciando ganhos elevados tanto em produtividade quanto em qualidade.

O sucesso da indústria canavieira está baseado, incontestavelmente, em cultivares que se adaptem bem ao clima, ao solo e às características intrínsecas de uma dada região de interesse. No Brasil, particularmente no Nordeste, destacam-se as variedades RB (República Brasileira) lançadas pelo Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-Açúcar, conduzido pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA. Essas variedades RB caracterizam-se pela produtividade e adaptação às condições edafoclimáticas de cada Região (RIDESA, 2005).

Como toda cultura agrícola, a produção da cana-de-açúcar é influenciada por um grande número de fatores ambientais. A busca por altos rendimentos a baixos custos implica em conhecer mais detalhadamente a fisiologia, bioquímica e genética da cultura, com o objetivo de racionalizar as relações entre os diferentes fatores de produção visando o máximo desempenho.

Em decorrência da posição de destaque que ocupa na economia mundial, essa cultura está freqüentemente inserida em programas de melhoramento de espécies cultivadas, visando à introdução de características de interesse agrônomo, como resistência a pragas e patógenos, aumento no teor de sacarose e tolerância a herbicidas e aos estresses ambientais (CIDADE et al., 2006).

2. CULTIVO *IN VITRO*

De acordo com Suzuki (2008), a cultura de tecidos ou cultivo *in vitro* de plantas pode ser definida como sendo a cultura de células, tecidos ou órgãos vegetais em condições assépticas. Essa tecnologia tem imprescindível papel na

produção de plantas importantes sob o ponto de vista agrônomo e ornamental e na manipulação de plantas para melhorar a produtividade agrícola.

Várias técnicas são aplicadas na cultura de tecidos, dentre elas estão a micropropagação, cultivo de meristema (limpeza clonal), cultivo de embrião zigótico, fusão de protoplastos e hibridação somática, suspensão celular, embriogênese somática, organogênese e seleção *in vitro*.

A micropropagação de cana-de-açúcar facilita a rápida multiplicação das novas variedades melhoradas e garante a produção de mudas isentas de doenças e pragas, algumas vezes transmitidas pelos métodos convencionais de propagação (GEIJSKES et al., 2003). Deste modo, ganhos consideráveis na produção dessa cultura têm sido observados. Ademais, o cultivo *in vitro* consiste de uma estratégia que contribui com avanços no melhoramento de plantas através da conservação do germoplasma *in vitro* e na produção de plantas geneticamente transformadas.

As técnicas de cultura de tecidos vêm sendo, ultimamente, utilizadas em estudos de seleção ou avaliação da tolerância de plantas, sendo, em alguns casos, vantajosos pela relativa rapidez de resposta e pela possibilidade de controle das condições ambientais, podendo contribuir no esclarecimento das alterações provenientes das condições de estresse (SILVA et al., 2001).

A cultura de tecidos evita as complexidades fisiológicas e estruturais da planta, podendo controlar a homogeneidade do estresse e suas implicações, e fornece importante ferramenta para o estudo dos efeitos da salinidade e seus mecanismos (KEREPESI et al., 2004). Assim, esta técnica torna-se conveniente para investigar as respostas das plantas de cana-de-açúcar submetidas ao NaCl.

3. ESTRESSE

O estresse é uma alteração fisiológica causada por fatores que tendem a alterar o equilíbrio dos organismos (GASPAR et al., 2002). Larcher (2004) refere-se ao estresse como um desvio das condições ótimas para a vida induzindo mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes. Taiz e Zeiger (2004) mencionam que em condições naturais e agrícolas as plantas estão freqüentemente expostas às condições de múltiplos estresses. Para Lawlor e Cornic (2002), os vários estresses ambientais afetam de maneira negativa o crescimento, o metabolismo e a

produtividade das plantas. Seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação são os fatores de estresse mais importantes que limitam a produção das culturas.

O estresse pode se manifestar em vários graus de severidade, com duração variável, combinados ou não, de modo contínuo ou alternando com momentos de normalidade. No que concerne às plantas, a intensidade do estresse vai depender do órgão ou do tecido alvo, do estágio de desenvolvimento da planta e do genótipo em questão. Levando-se em consideração esses fatores, o genótipo pode manifestar tolerância, sobrevivendo e crescendo, mesmo que em menores taxas, ou o genótipo pode manifestar suscetibilidade e, dependendo da intensidade do estresse, chegar à morte (CAMBRAIA, 2005).

3.1 Estresse Salino

A salinização dos solos pode ocorrer por fatores naturais ou antrópicos. Dentre os fatores naturais, as baixas umidades associadas à intensa evapotranspiração podem levar à formação de solos salinos, como ocorre em regiões áridas e semi-áridas. O homem, por meio de um inadequado manejo do solo e da água nos perímetros irrigados pode também induzir ou agravar o processo de salinização (ORCUTT e NILSEN, 2000).

O estresse salino é um dos grandes problemas enfrentados não só nas regiões do Nordeste brasileiro, mas, também, em muitas outras regiões do mundo (SILVEIRA et al., 2001). A maioria das espécies vegetais submetidas à salinidade tem o crescimento reduzido afetando sua produtividade. As consequências desse estresse manifestam-se na planta tanto no âmbito fisiológico e bioquímico (MUNNS et al., 2002) como no molecular (WINICOV, 1998).

Os efeitos do estresse salino podem ser classificados em primários e secundários. Os primários incluem os efeitos tóxicos específicos dos íons; os danos na permeabilidade das membranas celulares e de organelas citoplasmáticas; o desequilíbrio metabólico nos processos fotossintético e respiratório; anabolismo e catabolismo de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos; reações enzimáticas e conversões de fitormônios (WILLADINO e CAMARA, 2005). Já os secundários incluem efeitos osmóticos e deficiência de nutrientes induzida pela competição dos íons Na^+ e Cl^- com os demais durante o processo de absorção (LEVITT, 1980).

Sob estresse, as modificações das membranas podem ser evidenciadas através da liberação de solutos. Borochoy-Neori e Borochoy (1991) observaram que em plântulas de melão o extravasamento de eletrólitos sob tratamento salino foi mais rápido e com maior magnitude em comparação ao controle, indicando alteração nas propriedades das membranas. Uma das causas do aumento da liberação de eletrólitos é a peroxidação lipídica, causada por espécies reativas de oxigênio - ROS (QUEIROZ et al., 2002).

As alterações na membrana podem ocorrer, também, devido ao contato com o íon Na^+ , o que causa sua despolarização, podendo conduzir à interrupção dos mecanismos de absorção iônica e seletividade (GREENWAY e MUNNS, 1980). De acordo com Mansour (1995), o componente osmótico do estresse salino, ou seja, a menor disponibilidade de água para a planta, não confere danos à membrana plasmática. Os efeitos deletérios da salinidade referem-se essencialmente à ação dos efeitos tóxicos dos íons.

Quando as plantas são expostas à salinidade, o equilíbrio no transporte de íons Na^+ e Cl^- e de outros nutrientes minerais essenciais é interrompido. O íon cloreto é um dos solutos que contribui para a redução do potencial osmótico celular facilitando a absorção de água, entretanto, seu excesso provoca clorose e necrose das folhas, ocasionando queda de produção (MARSCHNER, 1990).

Os distúrbios metabólicos gerados pelo acúmulo de Na^+ na célula são, em parte, resultantes da competição com o íon K^+ pelos sítios ativos das enzimas. O aumento da concentração de Na^+ é acompanhado de redução na absorção de K^+ nos tecidos vegetais, proporcionando aumento excessivo na relação Na^+/K^+ . Essa relação é usada como um índice que permite estimar a toxidez de íon Na^+ , uma vez que esse cátion inibe a atividade das enzimas dependentes de íon K^+ . A capacidade de manter uma relação Na^+/K^+ relativamente baixa no citoplasma (cerca de 0,6) e a habilidade de transportar os íons Na^+ e Cl^- para longe dos sítios do metabolismo primário (folhas) são duas condições críticas para que ocorra o crescimento da planta em condições salinas (TESTER e DAVENPORT, 2003).

Sob estresse salino há redução no conteúdo de proteínas solúveis totais (SILVEIRA et al., 2003). Esse decréscimo pode refletir retardamento na síntese protéica ou aceleração na sua degradação, levando ao aumento na quantidade de aminoácidos livres ou à inibição da incorporação destes aminoácidos nas proteínas. A proteólise fornece aminoácidos necessários para a manutenção celular durante

distúrbios nutricionais, que podem ser causados pela salinidade. Kumar et al. (2008), observaram uma redução nos teores de proteínas totais solúveis em pinhão manso cultivado em meio com 100 mM de NaCl. Resultados similares foram encontrados por Piza et al. (2003) em plantas de abacaxi micropropagadas em tratamentos salinos aos 15 dias de cultivo *in vitro*.

A tolerância ao estresse salino requer uma série de adaptações integradas envolvendo sistemas celulares e metabólicos. A tolerância é uma característica multigênica com uma grande quantidade de genes responsáveis pela minimização dos efeitos do excesso de sal (MUNNS, 2005). Estes genes codificam proteínas fotossintéticas, proteínas ligadas ao transporte de íons para o vacúolo e enzimas antioxidantes. Muitos desses genes são induzidos sob estresse salino e têm sido detectados por ensaios de hipersalinização na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (ESTEVEZ e SUZUKI, 2008).

As plantas têm distintos níveis de tolerância as concentrações de sais. Utilizando uma variedade de mecanismos os vegetais ampliaram suas respostas bioquímicas e moleculares para tolerar o estresse salino através de produtos e processos alternativos (IYENGAR e REDDY, 1996). Esses mecanismos permitem que a planta restabeleça suas condições permitindo seu crescimento mesmo sob estresse.

Em termos moleculares, o sinal de estresse, uma vez produzido pela célula vegetal, deve ativar uma rota de transdução que envia a mensagem aos fatores de transcrição, que regulam a expressão dos genes encarregados da resposta ao estresse (Figura 1). A perda do volume e da turgescência celular ou a concentração de solutos altera a conformação de proteínas da parede celular e da membrana plasmática, ativando rotas de transdução de sinais que dão lugar à expressão de determinados genes, transformando o fenômeno do estresse em uma resposta bioquímica (WILLIADINO e CAMARA, 2005).

As estratégias bioquímicas incluem 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 (ESTEVEZ e SUZUKI, 2008).



Figura 1. Percepção de sinais externos e resposta da planta ao estresse salino

3.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um fator central do fenômeno de estresses abióticos e bióticos que ocorre quando há um sério desbalanço entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes (FOYER e NOCTOR, 2000). O rompimento do estado estacionário em favor da condição pro-oxidativa, elevando a concentração das ROS, favorece injúrias celulares tendo como consequências danos às biomoléculas como DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos (SIES, 1986).

Esses danos se traduzem em diversos processos degenerativos incluindo peroxidação de lipídeos de membrana, que leva à diminuição de fluidez, perda do conteúdo celular ou da organela e causa danos secundários às proteínas de membranas (HALLIWELL, 2006). As ROS podem causar hipo ou hipermetilação do DNA, deleção e substituição de bases no DNA, alterações cromossômicas (aneuploidias e poliploidias) e rearranjo cromossômico (CASSELLS e CURY, 2001). Proteínas expostas às ROS passam por modificações típicas, incluindo alterações na especificidade dos aminoácidos, fragmentação polipeptídica, agregação, desnaturação e susceptibilidade à proteólise (REDDY et al., 2004). A oxidação de carboidratos não é considerada deletéria, uma vez que os produtos não danificam componentes celulares (MOLLER et al., 2007). Assim, a oxidação de biomoléculas através do acúmulo de ROS durante o estresse oxidativo afeta seriamente o

metabolismo de plantas o que levam a disfunções fisiológicas, podendo acarretar em morte celular (SCANDALIOS, 2005).

As ROS são formadas como subprodutos tóxicos da respiração e fotossíntese. Os principais pontos de produção na célula, durante o estresse, são as organelas com alta atividade de oxidação metabólica: mitocôndrias e cloroplastos. Contudo, o fenômeno de fotorespiração nos peroxissomos é outra forma de produção de H_2O_2 (SOARES-NETO, 2001).

O oxigênio molecular (O_2) é completamente reduzido por quatro elétrons transportados ao longo da cadeia respiratória, gerando água (H_2O). No entanto, uma pequena parcela dos elétrons escapa da cadeia transportadora resultando em uma redução parcial do O_2 com a consequente produção das ROS (Figura 2). A transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 resulta na formação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}), respectivamente (NEILL e GOULD, 2003).

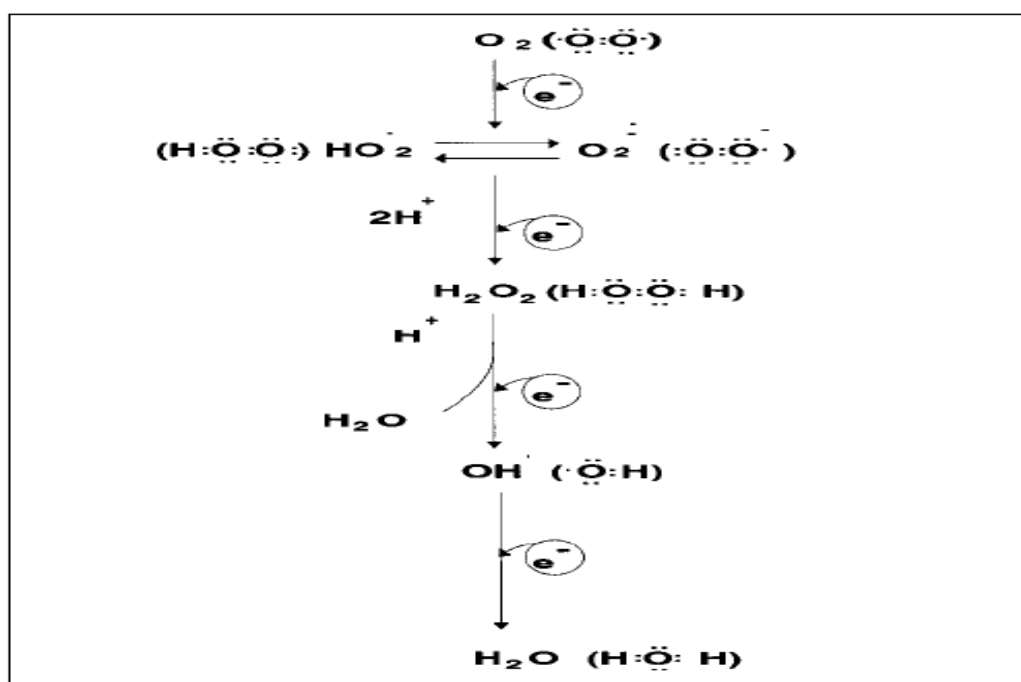


Figura 2. Redução tetraeletrônica do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo (Adaptado de COHEN, 1989)

Outras ROS conhecidas são o radical hidróperóxido (HO_2^{\bullet}) e o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). O HO_2^{\bullet} representa a forma protonada do radical superóxido e evidências mostram que o hidróperóxido é mais reativo, devido à maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (COHEN, 1989). O $^1\text{O}_2$,

considerado extremamente reativo, é gerado nos cloroplastos através da transferência de energia da clorofila foto-excitada para o O_2 (BARREIROS et al., 2006).

Contrário ao superóxido, o peróxido de hidrogênio é capaz de transpor as membranas celulares facilmente. E tal como o superóxido, o H_2O_2 é pouco estável e, portanto, menos tóxico que outras espécies reativas de oxigênio; a principal ameaça imposta pelo superóxido e peróxido de hidrogênio está na habilidade de ambos gerarem altas quantidades do radical hidroxila (SGHERRI e NAVARI-IZZO, 1995).

O radical hidroxila é considerado a ROS mais reativa em sistemas biológicos. Ela tem grande afinidade por moléculas biológicas em seu sítio de produção. A hidroxila apresenta uma meia-vida muito curta, pois reage muito rapidamente de forma não específica com as biomoléculas, sequestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio (BREUSEGEM et al., 2001).

As ROS são vistas como indicadores celulares de estresse e mensageiros secundários envolvidos em vários aspectos da expressão gênica e na tradução da química enzimática (FOYER e NOCTOR, 2003). Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, como o H_2O_2 e 1O_2 , são produzidos de forma contínua em qualquer sistema vivo. Conseqüentemente, os organismos desenvolveram diversos sistemas antioxidantes de defesa, visando à proteção contra os possíveis danos causados pelas ROS (GRATÃO et al., 2005).

Conforme Ribeiro et al. (2005), em baixas concentrações as ROS são consideradas mediadores de sinalização em mecanismo de ajuste celular durante o crescimento e desenvolvimento dos vegetais. Para Azevedo-Neto (2005), a produção excessiva de ROS, moléculas potencialmente tóxicas para as plantas, ativa a morte celular programada (apoptose) ou aumenta a resposta sistêmica de resistência, através dos complexos sistemas de defesa.

4. SISTEMA ANTIOXIDATIVO DE DEFESA

As estratégias adaptativas das plantas são utilizadas para limitar os efeitos do estresse salino. Os mecanismos complexos para resistência ao estresse iônico e osmótico incluem: ajustamento osmótico e proteção de estruturas sub-celulares, mediante a acumulação de solutos compatíveis, como a glicina betaína, prolina e polióis; manutenção da homeostase iônica intracelular, por meio da manutenção de

alta relação K^+/Na^+ citosólica, seqüestro de íons tóxicos para o vacúolo ou extrusão celular, e; eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) oriundos do estresse oxidativo (BRILHANTE et al., 2007).

Ao longo dos anos, vários estudos encontraram relação positiva entre níveis de antioxidantes e o grau de tolerância ao estresse em espécies e variedades de plantas (GRESSEL e GALUN, 1994).

A primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo é evitar a produção das ROS (NOCTOR et al., 2004). Uma vez formadas, as ROS devem ser eliminadas para minimizar os efeitos danosos. Diferentes mecanismos são utilizados pelas plantas para interromper a cascata de oxidação descontrolada (GRATÃO et al., 2005). Assim, mecanismos de desintoxicação constituem a segunda linha de defesa (MOLLER, 2001). A terceira linha de defesa está relacionada ao reparo dos danos oxidativos.

O termo antioxidante refere-se a compostos capazes de eliminar ROS sem que elas se convertam em radicais destrutivos. Os antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos funcionam na interrupção de cascatas descontroladas de oxidação. As enzimas antioxidantes são consideradas catalisadoras de reações ou estão envolvidas no processamento direto das ROS. (MEDICI et al., 2004).

A proteção enzimática das células e compartimentos sub-celulares dos efeitos citotóxicos das ROS se dá pela ativação da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11), glutathione redutase (GR – EC 1.6.4.2), catalase (CAT – EC 1.11.1.6), polifenoloxidase (PPO – EC 1.14.18.1) e peroxidase (POD – EC 1.11.1.7) (REDDY et al., 2004).

Além das enzimas antioxidativas, as plantas podem tolerar o estresse oxidativo pela síntese de moléculas como flavonóides, ascorbato, tocoferol, alcalóides, ácido ascórbico, carotenóides e poliaminas. Podem ainda sintetizar e acumular osmólitos compatíveis ou osmoprotetores como a prolina (LAWLOR e CORNIC, 2002)

Os sistemas de defesa removem ou neutralizam as ROS. Estudos sugerem que o apoplasto, citosol, cloroplasto, mitocôndria e peroxissomo contêm mecanismos de defesa às ROS (NOCTOR et al., 2004).

4.1 Enzimas

Os maiores mecanismos de defesa das plantas incluem as enzimas SOD, CAT, POD, PPO, APX e GR. O nível de estresse oxidativo é determinado pela quantidade de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e OH^{\bullet} presentes nas células vegetais.

Uma série de passos de detoxificação é requerida para evitar a conversão de uma espécie reativa em outra mais nociva. A SOD é considerada uma primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo por converter o $O_2^{\bullet-}$ à H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 deve ser removido a fim de evitar sua conversão em radicais mais reativos, como o radical OH^{\bullet} . Para isso, as enzimas APX, POD e CAT subsequentemente convertem o H_2O_2 à H_2O e O_2 (DEL RIO et al., 2002). O equilíbrio da atividade das enzimas é essencial para determinar o nível fixo de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (BOWLER et al., 1991).

Diferentemente da CAT, que degrada diretamente o H_2O_2 sem consumir agentes redutores celulares, a detoxificação pela APX ocorre com a oxidação de ascorbato, reação que resulta em monodeidroascorbato (MDHA) e H_2O . E a detoxificação pela POD ocorre com a oxidação de compostos de natureza fenólica (NAKANO e ASADA, 1980). A PPO promove a oxidação enzimática de compostos doadores de hidrogênio como fenóis, ela utiliza doadores de elétrons aromáticos como o pirogalol (ASADA, 1999).

Durante o estresse oxidativo, geralmente, a atividade das enzimas antioxidantes aumentam nas diferentes espécies vegetais. Plantas com elevados níveis de antioxidantes, constitutivos e induzidos, têm mostrado maior resistência ao estresse oxidativo (MITTOVA et al., 2003).

Alterações na atividade das enzimas antioxidantes reflete na resposta das plantas ao estresse salino. Como exemplo pode-se citar o aumento na atividade de CAT, SOD, POD e GR em uma macrófita aquática flutuante (*Pistia stratiotes* L.) sujeita às concentrações de 100 e 200 mM de NaCl (UPADHYAY e PANDA, 2005); acréscimo na atividade das enzimas CAT, APX e POD em plantas de trigo cultivadas em concentrações de 50 e 100mM de cloreto de sódio (MANDHANIA et al., 2006); incremento na atividade da CAT e POD em folhas de arroz sob 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl (LIMA, 2008); aumento da atividade da APX em folhas de sorgo a 100mM e 200mM de NaCl (HEIDARI, 2009); incremento da PPO, POD e CAT em plântulas de *Cassia angustifolia* L. submetidas a 20, 50 e 100 mM de NaCl (AGARWAL e

PANDEY, 2004) e, acréscimo da POD e PPO em folhas de *Mamordica charantia* aos 30 dias de cultivo a 25 e 75 mM de NaCl. (AGARWAL e SHAHEEN, 2007).

Reddy et al. (2004) sugerem que as enzimas removedoras de ROS, além de remover o H₂O₂ favorecem o fotossistema I, tornando o NADP disponível para aceitar os elétrons provenientes da ferredoxina, minimizando assim a formação do radical aniônico superóxido.

Sairam et al. (1998) demonstraram que os sistemas de remoção de ROS pelas enzimas ascorbato peroxidase, glutathione redutase e catalase são importantes para a diminuição da peroxidação lipídica, mantendo a estabilidade de membranas, bem como os conteúdos de clorofilas e carotenóides presentes.

4.2 Osmoprotetores

Os solutos orgânicos, que participam ativamente reduzindo o potencial osmótico, são comumente conhecidos como osmólitos compatíveis ou osmoprotetores, por serem solúveis e não interferirem no metabolismo citoplasmático, mesmo em altas concentrações. Destacam-se dois papéis funcionais para esses solutos: em altas concentrações atuam no ajuste osmótico e em baixas concentrações desempenham função protetora (MUNNS, 2005).

Os solutos compatíveis atuam como osmoprotetores de macromoléculas como proteínas e lipídeos, bem como nas membranas, por ter um caráter hidrofílico podem substituir a água na superfície das proteínas, por exemplo, e agir, não enzimaticamente, como chaperonas de baixo peso molecular, estabilizando a estrutura proteica (HASEGAWA et al., 2000).

O acúmulo de osmólitos em células de plantas resulta em um decréscimo no potencial osmótico e também na manutenção da absorção de água e da pressão de turgor, o que contribui para a manutenção dos processos fisiológicos, como abertura estomática, fotossíntese e crescimento (BLUM, 1996).

A classe de pequenas moléculas conhecidas como osmoprotetores inclui iminoácidos como a prolina, compostos quaternários de amônio (glicina betaína, prolina betaína, β-alanina betaína e colina-o-sulfato) e o composto terciário de sulfato, 3-dimetilsulfoniopropionato (DMSP). Os compostos quaternários de amônio e DMSP são derivados de precursores de aminoácidos (SAKAMOTO e MURATA, 2000).

5. PROLINA

L-prolina é um dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas de todos os organismos vivos. Aminoácidos são moléculas que contêm porções amino ($-\text{NH}_2$) e um grupo funcional carboxil ($-\text{COOH}$). A prolina, entretanto, contém uma porção imino ($\text{C}=\text{NH}$), um grupo funcional carboxil e um grupo imino secundário, tendo sido apontada como um importante osmoprotetor em muitas plantas.

A acumulação da prolina ocorre após os vários tipos de estresse, como seca, salinidade, altas e baixas temperaturas, metais pesados, deficiência de nutrientes, infecções por patógenos, entre outros (HARE e CRESS, 1997). Alguns autores sugerem que a acumulação de prolina represente um mecanismo compensatório para melhor sobrevivência das plantas durante o período de estresse, atuando como regulador osmótico, protetor contra a desnaturação enzimática, reserva de carbono e nitrogênio, estabilizador da síntese proteica e como sequestradora de ROS (DOLATABADIAN et al., 2008).

A prolina é o único dos solutos compatíveis para o qual foi demonstrada uma função protetora contra os danos induzidos pelo oxigênio singlete e por radicais livres. Ela atua eliminando o $^1\text{O}_2$ e seqüestrando OH^\bullet e ainda é capaz de estabilizar proteínas, DNA e membranas (KAVI KISHOR et al., 2005).

A prolina pode manter o pH citosólico e o equilíbrio do estado Redox. Pode fazer parte do sinal de estresse influenciando na resposta adaptativa da planta (VERBRUGGEN e HERMANS, 2008), e ainda pode ser uma fonte de energia, pois sua oxidação produz 30 ATPs (KAVI KISHOR et al., 2005).

A acumulação desse osmoprotetor, em condições de estresse, proporciona o NAD^+ e NADP^+ necessários para a manutenção dos processos respiratórios e fotossintéticos, respectivamente. Enquanto a síntese de prolina gera NADP^+ , sua degradação produz NADPH . Assim, o ciclo da síntese e degradação da prolina é essencial para manter o potencial redox no citosol e nos plastídeos (VERMA, 1999).

Bellinger et al. (1991) sugeriram que a acumulação de prolina não é um indicador de resistência e sim um indicador de tolerância adquirida, visto que diversos experimentos demonstram que células, calos e somaclones selecionados como tolerantes ao estresse apresentam uma maior acumulação de prolina do que os não adaptados.

Heuer (1994) observou que o acúmulo de prolina difere entre cultivares adaptadas a certas condições ambientais, assim como em espécies tolerantes à seca ou à salinidade, e que esse acúmulo depende da duração do estresse e da concentração dos sais.

5.1 Síntese e Degradação

A prolina parece ter sua síntese e catabolismo coordenados pelo controle de sua acumulação em plantas sob estresse (BRAY et al., 2000). A síntese e o acúmulo de solutos orgânicos é uma resposta muito freqüente em plantas submetidas a baixo potencial osmótico no meio externo (RAVEN, 1985).

Nas plantas existem dois precursores de prolina, o glutamato e a ornitina. A via principal, durante o estresse osmótico, é a do glutamato. A biossíntese ocorre no citosol e nos plastídeos, enquanto sua degradação ocorre nas mitocôndrias (VERBRUGGEN e HERMANS, 2008). O glutamato é convertido a prolina por duas reduções sucessivas catalisadas pelas enzimas pirrolina-5-carboxilato sintase (P5CS) e pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) (Figura 3). Segundo Szoke et al. (1992) a degradação da prolina é o processo inverso da biossíntese e é catalisada pelas enzimas prolina desidrogenase (PDH) e pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH) (Figura 3). O precursor alternativo para biossíntese de prolina é a ornitina. Roosens et al. (1998) constaram em plantas jovens de *A. thaliana* que a via da ornitina também contribui para o aumento de prolina.

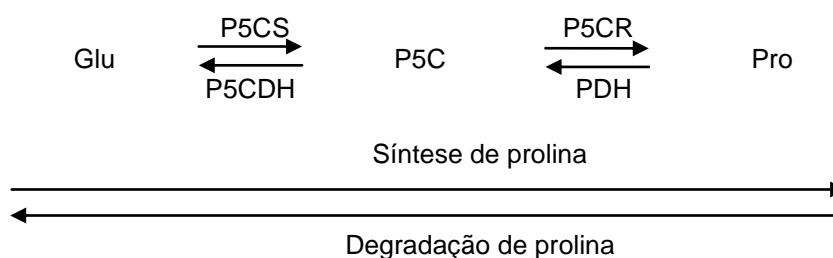


Figura 3. Representação das reações de síntese e degradação da prolina. P5CS: pirrolina-5-carboxilato sintase; P5CR: pirrolina-5-carboxilato redutase; P5CDH: pirrolina-5-carboxilato desidrogenase; PDH: prolina desidrogenase (Adaptado de VERBRUGGEN e HERMANS, 2008)

Nas plantas os níveis de P5CS e P5CR estão correlacionados com o conteúdo de prolina. Durante o estresse, apenas a expressão de P5CS está correlacionada com esse conteúdo. A atividade da P5CS nos cloroplastos pode

reciclar o NADP⁺, agindo como aceptor final da cadeia transportadora de elétrons, reduzindo a produção de ROS no flossistema I (VERBRUGGEN e HERMANS, 2008).

Sob a prolongada desidratação ou sob estresse salino, são ativados os genes que codificam a P5CS enquanto que o gene que codifica a PDH é reprimido, indicando que a prolina será acumulada em função da sua biossíntese (KAVI KISHOR et al., 2005).

A prolina, sob condições de estresse, pode ser uma chave de sinalização capaz de ativar múltiplas respostas que fazem parte do processo de adaptação. Há um grande interesse em melhorar plantas osmotolerantes para a agricultura. Isso tem sido conseguido, por exemplo, pela manipulação genética da produção de osmólitos. Na última década, foram feitas tentativas para aumentar o nível de prolina em plantas por transferência de genes associados com sua biossíntese. Tolerância à salinidade e melhoria no crescimento das plantas foram observadas em uma variedade de transgênicos com superprodução de prolina (KAVI KISHOR et al., 2005). Smirnoff e Cumbes (1989), analisando mutantes de *A. thaliana*, com inserção de *p5cs*, confirmaram o papel da prolina como sequestradora de ROS.

É, portanto, possível que culturas geneticamente manipuladas para a síntese de prolina sejam comercializadas no futuro, a fim de aumentar a tolerância das plantas aos vários estresses. Kavi Kishor et al. (2005) acreditam que diversos mutantes gerados ao longo dos anos, especialmente de *A. thaliana*, irão proporcionar uma avaliação do papel exato da prolina durante o estresse salino.

5.2 Mecanismos de acumulação de prolina induzidos por estresse

O aumento da concentração de prolina está sendo amplamente estudado em condições de estresse, especialmente sob estresse salino (CAMARA et al., 2000). Várias plantas, incluindo halófitas, acumulam altos níveis de prolina em resposta ao estresse osmótico como mecanismo de tolerância, tanto em elevados níveis de salinidade quanto em deficiência hídrica (MANIVANNAM et al., 2007).

Brilhante et al. (2007) indicaram que houve aumento significativo na acumulação de prolina em folhas de cajueiro anão submetidos a tratamentos com NaCl. Viégas et al. (1999), estudando plantas jovens de caju submetidas a 100mM de NaCl, também verificaram aumento no conteúdo de prolina.

Bezerra et al. (2001) constataram que o conteúdo de prolina dos calos de milho da cultivar Jatinã C3 anão, tenderam a aumentar com o incremento da concentração de NaCl até o nível de 150 mmol L⁻¹, mas em condições de estresse severo observou-se uma tendência ao decréscimo no conteúdo desse iminoácido. Camara et al. (2000) observaram que a adição de prolina exógena ao meio de cultura reduziu o efeito prejudicial do mais alto nível de sal (205 mM de NaCl), em calos de dois genótipos de milho.

Rodríguez et al. (1997) afirmaram que plantas de milho respondem positivamente à salinização com a manutenção de maiores concentrações de prolina. O nível desse soluto aumenta com a adição de NaCl e com o tempo de exposição das plantas ao sal, sugerindo um papel protetor da prolina. Garcia e Medina (2003) encontraram resultados semelhantes em folhas e raízes de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos a 100 mM de NaCl.

De acordo com Rossi et al. (1997), nas folhas de feijoeiro cultivado em solução contendo NaCl, ocorreu um aumento nos níveis de prolina. Lima et al. (1997) observaram que o aumento nos níveis de prolina, detectados tanto no cotilédone como no embrião de sementes de feijoeiro tratadas com NaCl, seria um ajuste osmótico, mecanismo da planta em tolerar o baixo potencial osmótico criado pelo nível de NaCl.

Utilizando folhas de canola em condições de estresse salino, Dolatabadian et al. (2008) confirmaram que o conteúdo de prolina foi superior no tratamento com NaCl. Jaleel et al. (2007), estudando o metabolismo da prolina em *Phyllanthus amarus*, também verificaram aumento na acumulação de prolina sob salinidade. Esses autores associaram o fato ao concomitante aumento da enzima que sintetiza a prolina e à diminuição da enzima que atua na sua degradação.

Estudo feito com manitol, sorbitol, mio-inositol e prolina demonstram que a prolina é um eficaz sequestrador do radical hidroxila (SMIRNOFF e CUMBES, 1989). Paleg et al. (1984) constataram que a atividade das enzimas catalase, peroxidase e polifenoloxidase foram promovidas pela prolina.

Estudos sugerem que a relação da aplicação de prolina exógena e a atividade das enzimas antioxidativas não é simples. Ozden et al. (2008) demonstraram que a aplicação de prolina em folhas de videira causou diminuição na atividade da SOD e CAT. Por outro lado, a atividade da APX e da POD foi aumentada com a aplicação desse iminoácido. A aplicação de prolina exógena em tabaco resultou num aumento

da atividade da SOD, CAT e POD em células submetidas ao estresse salino (Hoque et al., 2007). Resultados similares foram encontrados por Khedr et al. (2004), que observaram incremento na atividade da CAT e POD em *Pancratium maritimum* na presença de prolina.

O nível de tolerância de várias plantas ao estresse é aumentado pela aplicação exógena de alguns solutos compatíveis. A manipulação de teores endógenos e exógenos de prolina vem sendo explorada e resulta em dados importantes, porém, bastante variados, principalmente ao avaliar a relação da prolina às atividades das enzimas antioxidantes. Ainda não se tem dados conclusivos sobre a aplicação de prolina exógena associada ao estresse oxidativo (OZDEN et al., 2008).

Análises das alterações bioquímicas em plantas sob situação de estresse oxidativo, induzido pelo estresse salino, podem ser utilizadas como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento para a seleção de genótipos tolerantes aos estresses ambientais.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; PANDEY, V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v.48, p.555-560, 2004.
- AGARWAL, S.; SHAHEEN, R. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p. 149-161, 2007.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.601-639, 1999.
- AZEVEDO-NETO, A.D. Estresse salino, estresse oxidativo e tolerância cruzada em plantas de milho. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E.L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTI, U.M.T. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.
- BARBOSA, M.H.P.; BASTOS, I.T.; SILVEIRA, L.C.I.; OLIVEIRA, M.W. Análise de causa e efeito para produção de colmos e seus componentes na seleção de famílias de cana-de-açúcar. In: Congresso Nacional da STAB, 8., 2002, Recife. **Anais...** Recife: STAB, p. 366-370, 2002.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. São Paulo, v.29, p. 113-123, 2006.
- BELLINGER, Y; BENSOUUD, A.; LARHER, F. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. In: ACEVEDO, E.; CONESA, A.P.; SRIVASTAVA, J.P. (Eds.). **Physiology- breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments**. INRA, p. 449-458, 1991.
- BEZERRA, J.S.; WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Crescimento de calos embriogênicos de milho submetidos ao estresse salino. **Scientia Agricola**, v.58, n.2, p.259-263, 2001.
- BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. **Plant Growth Regulation**, v.20, p.135-148, 1996.
- BOROCHOV-NEORI, H.; BOROCHOV, A. Response of melon plants to salt: 1. Growth, morphology and root membrane properties. **Journal Plant Physiology**, v. 139, p. 100-105, 1991.
- BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRANDEN, S.; DERYCKE, R.; BOTTERMAN, J.; SYBESMA, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Manganese superoxide-dismutase can reduce cellular-damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. **EMBO Journal**. Oxford, v. 10, p. 1723-1732, 1991.
- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (eds). **Biochemistry &**

Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, cap.22, p.1158-1203, 2000.

BREUSEGEM, F.V.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

BRILHANTE, J.C.A.; SILVEIRA, J.A.G.; ROCHA, I.M.A; MORAIS, D.L; VIEGAS, R.A. Influência do tempo de aclimação na resposta do cajueiro à salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v. 11, n. 2, p. 173-179, 2007.

CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; TORNÉ, A.M.; SANTOS, M.A. Efeito do estresse salino e da prolina exógena em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 2, p. 146-155, 2000.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E.L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**, p., 95-105, 2005.

CASSELLS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 145-157, 2001.

CESNIK, R; MIOCQUE, J. **Melhoramento genético da cana-de açúcar**. Embrapa Informações Tecnológicas. Brasília-DF, p. 31-45, 2004.

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

CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTOS-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med**, v. 111, p. 918-31, 1989.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar safra 2009/2010, segundo levantamento, setembro/2009**. 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 11 nov., 2009.

DEDEMO, G.C. **Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em duas cultivares de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). UNESP-Jaboticabal, 94 p. 2006.

DOLATABADIAN, A.; SANAVY, S.A.M.M.; CHASHMI, N.A. The Effects of Foliar Application of Ascorbic Acid (Vitamin C) on Antioxidant Enzymes Activities, Lipid Peroxidation and Proline Accumulation of Canola (*Brassica napus* L.) under Conditions of Salt Stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, p. 206–213, 2008.

ESTEVEES, B.S.; SUZUKI, M.S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n. 4, p. 662-679, 2008.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, Cambridge, v.146, n. 3, p.359-388, 2000.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v.119, n. 3, p. 355–364. 2003.

GARCÍA, M.; MEDINA, E. Crecimiento y acumulación de prolina en dos genotipos de caña de azúcar sometidos a salinización con cloruro de sodio. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Caracas v.20, n.2, p.168-179, 2003.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F. DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, n. 37, p. 263–285, 2002.

GEIJSKES, R.J.; WANG, L.; LAKSMANAN, P.; MCKEON, M.G.; BERDING, N.; SWAIN, R.S.; ELLIOTT, A.R.; CROF, C.P.L; JACKSON, J.A.; SMITH, G.A. Smart Sett TM seedlings: tissue cultured seed plants for the Australian sugar industry. **Sugar Cane International**, p. 13-17, 2003

GRATÃO, P.L.; PRASAD, M. N.V.; CARDOSO, P. F.; LEAD, P.J.; AZEVEDO, R.A.A. Phytoremediation: green technology for the cleanup of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. Campinas, v.17, n.1, p.53-64, 2005.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p.149-190, 1980.

GRESSEL, J.; GALUN, E. Genetic controls of photooxidant tolerance. In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (eds). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. CRC Press Inc. Boca Raton, FL, USA. p. 237-273, 1994.

HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312–322, 2006.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v.21, p.79-102, 1997.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. California, v.51, p.463-499, 2000.

HEIDARI, M. **Antioxidant activity and osmolyte** concentration of sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*) genotypes under salinity stress. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 240-244, 2009.

HEUER, B. Osmoregulatory role of proline in water-and saltstressed plants. In: PESSARAKI, M. (Ed.) **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker, p.363-383, 1994.

HOQUE, M.A.; OKUMA, E.; BANU, M.N.A.; NAKAMURA, Y.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 553-561, 2007.

IYENGAR, E.R.R.; REDDY, M.P. Photosynthesis in highly salt tolerant plant. In: M. Pesserkali (ed.). **Handbook of photosynthesis**. Marshal Dekar, Baten Rose, USA, p. 897–909, 1996.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; LAKSHMANAN, G.M.A.; SRIDHARAN, R.; PANNEERSELVAM, R. NaCl as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 330, p. 806–813, 2007.

KAVI KISHOR, P.B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R.N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K.R.; RAO, K.R.S.S.; SREENATH RAO; REDDY, K.J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current science**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

KEREPESI, I.; BANYAI-STEFANOVITS, E.; GALIBA, G. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 131-133, 2004.

KHEDR, A.H.A.; ABBAS M.A.; WAHID, A.A.A.; QUICK, W.P.; ABOGADALLAH, LARCHER, W. A Planta sob Estresse. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, p. 341-478, 2004.

KUMAR, N.; PAMIDIMARRI, S.D.V.N.; KAUR, M.; BORICHA,G.; REDDY, M.P. Effects of NaCl on growth, ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus cultures of *Jatropha curcas*. **Biologia**, v. 63, p. 378-382, 2008.

LARCHER, W. A Planta sob Estresse. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, p.341-478, 2004.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant and Cell Environment**. v.25, p.275-294, 2002.

LEVITT, J. **Response of plants to environmental stress**. 2 ed. New York: Academic Press, p.365-488, 1980.

LIMA, M.G.S. detecção de genes e expressão enzimática em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) crescidas sob estresse sal. 2008. 93p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Pelotas: UFP/IB, 2008.

LIMA, G.P.P.; ROSSI, C.; HARVOORT, D.M.R. Atividade de peroxidases (ec 1.11.1.7) e teor de prolina no embrião e cotilédones de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 54, n. 3, 1997.

MANDHANIA, S.; MADAN, S.; SAWHNEY, V. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 50, p. 227-231, 2006.

MANIVANNAN, P.; JALEEL, C.A.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; SOMASUNDARAM, R.; LAKSHMANAN, G.M.A.; PANNEERSELVAM, R. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress, Colloids Surf. B: **Biointerfaces**, v. 59, n. 2, p. 141–149, 2007.

MANSOUR, M.M.F. NaCl alteration of plasma membrane of *Allium cepa* epidermal cells, Alleviation by calcium. **Journal Plant Physiology**, v. 145, p. 726-730, 1995.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plant**. 4 ed. London: Academic Press, 1990. 674p.

MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**. Collingwood, v. 31, p. 1-9, 2004.

MITTOVA, V.; TAL, M.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 845–856, 2003.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459–481, 2007.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. California, v. 52, p. 561-591, 2001.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bring them together. **New Phytologist**, Cambridge, v. 167, p. 645-663, 2005.

MUNNS, R.; HUSAIN, S.; RIVELLI, A.R.; HARE, R.A. Progress in plant nutrition. **Dordrecht: Kluwer Academic**, 2002, 188p.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. **Plant and Cell Physiology**, v. 21, p. 1295-1307, 1980.

NEILL, S.O.; GOULD, K.S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 30, p.865–873, 2003.

NOCTOR, G.; DUTILLEUL, C.; DE PAEPE, R.; FOYER, C.H. Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis,

stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 55, p. 49-57, 2004.

ORCUTT, D.M.; NILSEN, E.T. **The physiology of plants under stress-soil and biotic factors**. New York: John Wiley and Sons. 2000, 683p.

OZDEN, M.; DEMIREL, U.; KAHRAMAN, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. **Scientia Horticulturae**, 3041, 6 p., 2008.

PALEG, L.G., STEWARD, G.R.; BRADBEER, J.W. Proline and glycine betaine influence protein solvation. **Plant Physiology**. Rockville, v. 75, n. 4, p. 974–978, 1984.

PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, p. 361-366, 2003.

QUEIROZ, C.G.S.; GARCIA Q.S.; LEMOS FILHO, J.P. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membranas em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 59-63, 2002.

RAVEN, J.A. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. **New Phytologist**, v. 101, p. 25-77, 1985.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1189-1202, 2004.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Boletim Técnico de Lançamento de novas variedades RB de Cana-de-açúcar**. (Eds: SIMÕES-NETO, D.E.; MELO, L.J.O.; CHAVES, A.; LIMA, R.O.R.). Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 28p. 2005. (Boletim Técnico N° 1).

RODRÍGUEZ, H.G.; ROBERTS, J.K.M.; JORDAN, W.R.; DREW, M.C. Growth, water relation, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. **Plant Physiology**. Rockville, v. 113, n. 3, p. 881-893, 1997.

ROOSENS, N.H.; THU, T.T.; ISKANDAR, H.M.; JACOBS, M. Isolation of the ornithine-d-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol**, v. 117, p. 263–271, 1998.

ROSSI, C.; LIMA, G.P.P.; HARVOORT, D.M.R. Atividade de peroxidases (ec 1.11.1.7) e teor de prolina em feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 54, n. 3, 1997.

SACILOTO, R.F.Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 74 p. 2003.

SAIRAM, R.K.; DESHMUKH, P.S.; SAXENA, D.C. Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. **Biologia Plantarum**, v.41, p.387-394, 1998.

SAKAMOTO, A.; MURATA, N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.81-88, 2000.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SGHERRI, C.L.M.; NAVARRI-IZZO, F. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v.93, p.25-30, 1995.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem Int. Ed Engl**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SILVA, J.A.B.; OTONI, W.C.; MARTINEZ, C.A.; DIAS, L.M.; SILVA, M.A.P. Microtuberization of Andean potato species (*Solanum spp.*) as effected by salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 89, p.91-101, 2001.

SILVEIRA, J.A.G.; MELO, A.R.B.; VIÉGAS, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Salt-induced effects on the nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, n. 2, p. 171-179, 2001.

SILVEIRA, J.A.G.; VIÉGAS, R.A.; ROCHA, I.M.A.; MOREIRA, A.C.O.M.; MOREIRA, R.A.; OLIVERIA, J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthase activity are increased by salt-induced protolysis in cashew leaves. **Journal Plant Physiology**, v. 160, p. 115-123, 2003.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

SOARES-NETO, L.E. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. (1-4), p. 93-102, 2001.

SOUZA, G.M.; SILVA, A.M. Desvendando as vias de transdução de sinal da cana-de-açúcar. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.25, p.58-63, 2002.

SUZUKI, R. M. **Revisão das Aplicações da Pesquisa de Cultura de Tecidos Vegetais**. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/~rmsuzuki/cultura.htm>>. Acesso em: 13/10/2008.

SZOKE, A.; MIAO, G.H.; HONG, Z.; VERMA, D.P.S. Subcellular location of D1-pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. **Plant Physiol**, v. 99, p. 1642–1649, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. ARTMED Editora S.A. Porto Alegre, 3 ed., p. 613-643, 2004.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals of Botany**, v.91, p.503-527, 2003.

UPADHYAY, R.K.; PANDA, S.K. Salt tolerance of two aquatic macrophytes, *Pistia stratiotes* and *Salvinia molesta*. **Biologia Plantarum**, v. 49, p. 157–159, 2005.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p. 753–759, 2008.

VERMA, D.P.S. Osmotic stress tolerance in plants: Role of proline and sulfur metabolisms. In: SHINOZAKI, K. e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (Eds.) **Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants**. Landes Company. Texas, p. 153–168, 1999.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 1–7, 2001.

VIÉGAS, R.A.; MELO, A.R.B. and SILVEIRA, J.A.G. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew in response to salt (NaCl) shock. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 21-28, 1999.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Tolerância das plantas à salinidade: Fisiologia, genética e melhoramento. In: WORKSHOP: USO E REUSO DE ÁGUAS DE QUALIDADE INFERIOR – REALIDADES E PERSPECTIVAS. Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande, Universidade Federal da Paraíba, 2005. p. 508-535.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In: Eds. NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E.L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. p. 118-126, 2005.

WINICOV, I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. **Annals of Botany**, v. 82, n. 6, p. 703-710, 1998.

CAPÍTULO II

AÇÃO DA PROLINA EXÓGENA EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADOS *IN VITRO* SOB ESTRESSE SALINO

Ação da prolina exógena em genótipos de cana-de-açúcar cultivados *in vitro* sob estresse salino

Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros^{1*};

Manuela Maria Cavalcante Granja¹;

Gilberto de Souza e Silva Junior²;

Lilia Willadino³.

1. Mestrandas em Melhoramento Genético de Plantas, Departamento de Agronomia- Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Rua: Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife-PE, CEP: 52171-900, fone: (81) 3320-6364.

*Autor correspondente: jaislanny@yahoo.com.br

2. Professor do Instituto Federal de Pernambuco-IFPE – Campus Vitória de Santo Antão –PE

3. Professora do Departamento de Biologia da UFRPE e membro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade-INCTSal

Ação da prolina exógena em genótipos de cana-de-açúcar cultivados *in vitro* sob estresse salino

RESUMO – O cultivo da cana-de-açúcar sofre influência de estresses abióticos. A salinidade pode induzir o estresse oxidativo originado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam danos a biomolécula e estruturas celulares. Esses danos podem ser evitados pelo sistema de defesa enzimático e não enzimático das plantas. Os objetivos desse estudo foram avaliar a ação de prolina exógena no cultivo *in vitro* de genótipos de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) submetidos ao estresse salino e analisar as alterações bioquímicas que ocorrem nessas condições. As plantas foram cultivadas durante 20 dias na ausência ou presença de 20 mM de prolina associada ou não a 100 mM de NaCl, totalizando cinco tratamentos. Nos tratamentos salinos, ambos os genótipos apresentaram redução na integridade de membrana, causada, sobretudo, pela peroxidação lipídica. As plantas cultivadas sob estresse salino apresentaram redução no teor de proteínas solúveis totais e paralelamente manutenção ou acréscimo no teor de prolina endógena, osmólito compatível utilizado na defesa não enzimática dos vegetais. O sal também promoveu o aumento na concentração de Na⁺ e diminuição de K⁺ gerando, conseqüentemente, uma elevada relação Na⁺/K⁺. A atividade das enzimas catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e polifenoloxidase, responsáveis pela eliminação das ROS, aumentaram em função da salinidade em ambos os genótipos. O genótipo RB931011 apresentou uma maior aclimação quando comparado ao genótipo RB872552 devido ao maior aumento do teor de prolina e maior atividade das enzimas antioxidantes o que evitou um maior dano de membrana provocado pelo NaCl.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum* L., ROS, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes.

Action of exogenous proline in genotypes of sugarcane grown *in vitro* under salt stress

ABSTRACT – The cultivation of sugarcane is influenced by abiotic stresses. Salinity can induce oxidative stress caused by the accumulation of reactive oxygen species (ROS) that cause damage to bimolecular and cellular structures. Such damage can be avoided by enzymatic defense system and non-enzymatic plant. The objectives of this study were to evaluate the effects of exogenous proline in cultivation *in vitro* of sugarcane (RB931011 and RB872552) submitted to salt stress and analyze the biochemical changes that occur in these conditions. Plants were grown for 20 days in the absence or presence of 20 mM proline with or without 100 mM of NaCl, totaling five treatments. In the saline treatments, both genotypes showed a reduction in membrane integrity, caused mainly by lipid peroxidation. Plants grown under salt stress showed a reduced in the level of total soluble proteins and in parallel maintenance or increase in the endogenous proline content, compatible osmolyte used in non-enzymatic defense of plants. The salt also promoted the increase in the concentration of Na⁺ and decreased K⁺ generating thus a high ratio Na⁺/K⁺. The activity of catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase and polyphenoloxidase, responsible for the elimination of ROS, increased with increasing salinity in both genotypes. The RB931011 genotype had a greater acclimation compared to genotype RB872552 due to the greater increase in proline content and increased activity of antioxidant enzymes, thereby preventing further damage of membrane caused by NaCl.

Key words: *Saccharum officinarum* L., ROS, oxidative stress, antioxidant enzymes.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma fonte de riqueza para a economia brasileira principalmente pela produção de açúcar e etanol (Souza & Silva, 2002). O setor sucroalcooleiro do Brasil é o mais competitivo do mundo, possui os maiores níveis de produtividade e rendimento industrial e os menores custos de produção (Saciloto, 2003). No entanto, sua produtividade sofre influência de diversos fatores ambientais.

A salinização dos solos é um dos sérios problemas enfrentados em regiões áridas e semi-áridas, em razão, sobretudo, da intensa evapotranspiração e do inadequado manejo do solo e da água nos perímetros irrigados (Silveira et al., 2001). O estudo da tolerância à salinidade é de especial importância, pois o cloreto de sódio limita a produção agrícola devido aos efeitos osmóticos, que causam decréscimo do potencial hídrico na rizosfera, e à toxicidade iônica do Na^+ e do Cl^- (Mansour & Salama, 2004).

O excesso de sais cria uma condição estressante que provoca alterações metabólicas nas plantas. O estresse salino desencadeia o estresse oxidativo, caracterizado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Esteves & Suzuki, 2008). As plantas protegem suas células dos efeitos citotóxicos das ROS com o auxílio de enzimas antioxidantes, como peroxidase, ascorbato peroxidase, catalase e polifenoloxidase (Reddy et al., 2004); e ainda pela síntese e acúmulo de osmoprotetores como a prolina. Tem sido sugerido que a prolina possui importante função protetora contra os efeitos deletérios dos estresses abióticos (Lawlor & Cornic, 2002).

Diante do exposto, os objetivos desta pesquisa foram avaliar a ação de prolina exógena no cultivo *in vitro* de genótipos de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) submetidos ao estresse salino e analisar as alterações bioquímicas que ocorrem nessas condições.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal e tratamentos de estresse

O experimento e as análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, em Recife.

Foram utilizadas plantas micropropagadas em Sistema de Imersão Temporária cedidas pela Biofábrica Governador Miguel Arraes – CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste). Foram avaliados os genótipos RB931011 e RB872552 desenvolvidos no Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar-PMGCA na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina-PE (EECAC/UFRPE).

O genótipo RB931011 é um clone e ainda não foi disponibilizado no mercado. O genótipo RB872552 apresenta alta produtividade agrícola e industrial; elevada produção de açúcar por área e é pouco exigente à fertilidade do solo (Ridesa, 2005).

O meio de cultura foi constituído pelos sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 30 g. L⁻¹ de sacarose, 0,1 g. L⁻¹ de inositol e 0,3 mg. L⁻¹ de BAP (6-benzil aminopurina). O pH foi ajustado para 5,8 e o meio autoclavado durante 20 minutos a temperatura de 120°C e 1,5 atm de pressão de vapor. As plantas dos dois genótipos foram cultivadas *in vitro* em frascos contendo 30 mL de meio e mantidas em sala de crescimento, durante oito semanas, a 27 ± 1°C com fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 50 µmol. m⁻² s⁻¹ de irradiância.

Foram estabelecidos cinco tratamentos com diferentes condições de estresse: T0 = sem NaCl e sem prolina; T1: aplicação das plantas em 20 mM de prolina por 24 horas e posterior inoculação em meio contendo 100 mM de NaCl; T2 = aplicação das plantas em 20 mM de prolina por 72 horas e posterior inoculação em meio contendo 100 mM de NaCl; T3 = inoculação das plantas em meio contendo 100 mM de NaCl; T4 = inoculação em meio

contendo 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Foram utilizadas 20 repetições por tratamento, e a unidade experimental foi constituída de cinco plantas por frasco. As plantas foram submetidas a esses tratamentos durante 20 dias e, após este período, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -20°C até sua utilização para as análises químicas e bioquímicas.

2. Determinação do extravasamento de eletrólitos, dos teores de prolina e proteínas solúveis totais

Amostras de tecido vegetal da parte aérea foram coletadas, de forma aleatória, entre as repetições de cada tratamento para a preparação dos extratos.

O extravasamento de eletrólitos foi avaliado por meio de condutivímetro (LFT 613T, Schott Geratie) a partir de segmentos foliares contendo, em média, 0,03 g de tecido fresco. Os segmentos permaneceram em tubos de ensaio, imersos em 15 mL de água destilada por 24 horas, sendo realizada a primeira leitura, a condutividade elétrica livre (CL). Em seguida, os tubos de ensaio permaneceram em banho-Maria por uma hora a 100°C, quando foi realizada a segunda leitura, a condutividade elétrica total (CT). A partir desses dados, a porcentagem de integridade absoluta da membrana (PIA) foi calculada conforme a equação: $PIA = (1 - CL/CT) \times 100$ (Azevedo et al., 2008).

O conteúdo de prolina foi determinado de acordo com o método proposto por Bates et al. (1973). Foram macerados 0,1 g de matéria fresca em 5,0 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. Em seguida, 1,0 mL do sobrenadante foi colocado em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de ácido acético glacial e 1,0 mL de ninidrina ácida e colocados em banho-Maria a 100°C durante uma hora. Posteriormente, os tubos de ensaio foram submetidos a um banho de gelo e foram acrescidos 2,0 mL de tolueno para separação das fases. A fase superior, de cor rosada, foi aspirada e a absorbância foi medida a 520 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220).

A quantificação das proteínas solúveis totais nos extratos foi realizada empregando-se a metodologia descrita por Bradford (1976). A 2,0 mL da solução do reagente Azul Brillante de Commassie foram adicionados a 0,1 mL das soluções padrões de proteína (50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de Albumina de soro bovino-BSA) e 0,1 mL dos extratos. Após cinco minutos da reação a absorvância do complexo formado foi medida espectrofotometricamente em 595 nm. Foi construída a curva analítica padrão e determinada a concentração de proteína no extrato.

3. Determinação dos teores de Na^+ e K^+

Amostras da parte aérea foram postas em estufa de secagem a 70°C durante 48 horas. Foi pesado 0,1 g de matéria seca e colocado em tubo digestor contendo 5,0 mL de ácido nítrico concentrado e 1,0 mL de ácido perclórico concentrado, permanecendo em repouso por 24 horas. Os tubos foram colocados em bloco digestor, obedecendo a sequência de tempo e temperatura: 1h a 80°C, 1h a 120°C, 1h a 150°C e 1h a 180°C; após o resfriamento, transferiu-se o digerido para um frasco de plástico completando-se o volume para 100 mL com água destilada; Em seguida, efetuou-se a leitura dos íons Na^+ e K^+ em fotômetro de chama - Micronal-B462 (Bezerra-Neto & Barreto, 2004).

4. Análises enzimáticas

O extrato das folhas foi preparado para as análises pela homogeneização de 0,1 g de matéria fresca em 4,0 mL do tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6.5) com 0,05 g de polivinilpirrolidona (PVP). O homogenado foi centrifugado a 10.000 x g a 4°C por 10 minutos (Zeraik et al., 2008). A solução sobrenadante foi armazenada em freezer a -20°C e utilizada como fonte para determinação das proteínas solúveis totais e das enzimas catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX) e polifenoloxidase (PPO).

Para a catalase, a decomposição do peróxido de hidrogênio foi observada pelo declínio da absorbância a 240 nm por minuto (Berris & Sizer, 1952). O sistema de reação foi constituído de uma solução contendo 1,39 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0); 0,05 mL do extrato enzimático e 0,06 mL de H₂O₂ 500 mM.

A atividade da peroxidase foi estimada com base no aumento da absorbância pela oxidação do guaiacol e concomitante redução do peróxido de hidrogênio. A mistura analisada continha 1,35 mL de guaiacol (0,05 M); 0,1 mL do extrato enzimático e 0,05 mL de H₂O₂ (10,3 mM) (Fatibello-Filho & Vieira, 2002). Depois de 1 minuto de reação, a absorbância do tetraguaiacol formado foi medida em 470 nm.

A atividade da ascorbato peroxidase foi determinada pela diminuição do ascorbato e mensurada pela mudança na absorbância a 290 nm, no intervalo de 1 minuto (Nakano & Asada, 1981). A mistura da reação foi constituída de uma solução contendo 1,335 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0); 0,075 mL de ácido ascórbico 10 mM; 0,075 mL do extrato enzimático e 0,015 mL de H₂O₂ 100 mM.

Na determinação da polifenoloxidase foram usados 1,0 mL da solução do pirogalol (50 M) e 0,25 mL do extrato enzimático. Essa mistura permaneceu no escuro durante 5 minutos, sendo interrompida a reação com a adição de 0,25 mL de ácido sulfúrico a 5%. Posteriormente, a absorbância da reação foi medida a 420 nm em espectrofotômetro (Kar & Mishra, 1976).

A atividade específica das enzimas CAT, POD e APX foi expressa em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ decomposto. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína e para enzima PPO foi expressa em $\mu\text{mol de pirogalol}$ decomposto. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

5. Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de 2x5 (dois genótipos e cinco tratamentos), com 20 repetições de 5 plantas por tratamento. As

análises foram realizadas em três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT (Silva & Azevedo, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ambos os genótipos ocorreu uma redução da integridade da membrana em função da adição de NaCl ao meio de cultura, independente da adição de prolina (Figura 1). A prolina, portanto, não foi eficiente em minimizar os danos à membrana provocados pela presença de NaCl, independente da forma de aplicação deste iminoácido. O genótipo RB931011 destacou-se por apresentar tendência à menor redução na integridade da membrana (7,55%) em relação ao genótipo RB872552 que apresentou uma redução de 18,73%, quando comparado ao tratamento controle.

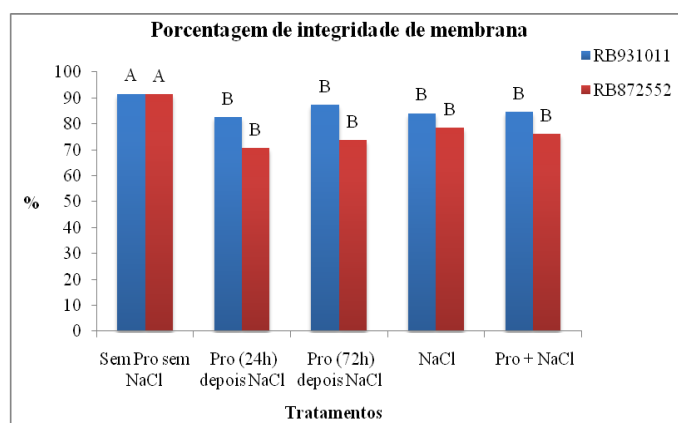


Figura 1. Porcentagem de integridade absoluta de membrana em dois genótipos de cana-de-açúcar micripropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais, no mesmo genótipo, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os dados obtidos estão de acordo com os resultados encontrados em folhas de arroz por Lutts et al. (1999) e Panda & Upadhyay (2003) e em folhas de trigo por Mandhania et al. (2006), os quais constataram que o estresse salino promove o extravasamento de eletrólitos. A

estabilidade da membrana celular vem sendo amplamente utilizada para diferenciar genótipos sensíveis de tolerantes (Sundhakar et al., 2001).

A adição de prolina exógena ao meio de cultura resultou num incremento, superior a dez vezes, dos teores de prolina endógena em ambos os genótipos. As plantas do genótipo RB872552 não apresentaram acúmulo de prolina como resposta à adição de NaCl ao meio de cultura, exceto nas plantas do tratamento com imersão em prolina por 72 horas. Por outro lado, as plantas do genótipo RB931011 apresentaram incremento da prolina endógena em todos os tratamentos salinos (Figura 2) quando comparado ao tratamento controle (sem Pro e sem NaCl). O aumento da prolina em função da salinidade corrobora com os resultados encontrados por diferentes autores. García & Medina (2003) constataram a acumulação de prolina em folhas e raízes de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos durante 60 dias a 100 mM de NaCl.

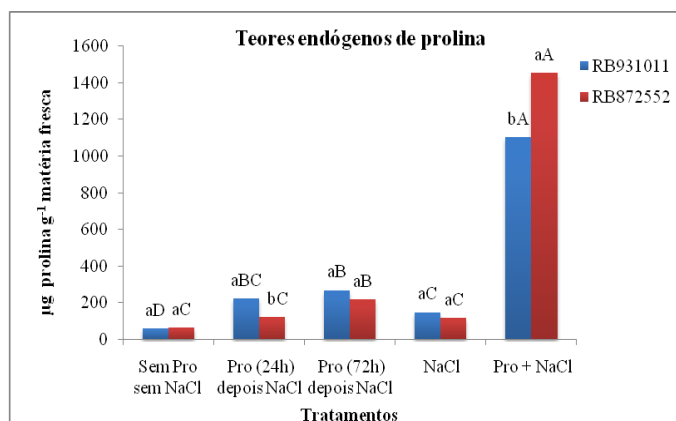


Figura 2. Teores endógenos de prolina em dois genótipos de cana-de-açúcar micropropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo, e minúsculas, no mesmo tratamento, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

O aumento no conteúdo de prolina está de acordo com os resultados observados em várias culturas submetidas à salinidade. Em calos de milho da cultivar Jatinã C3 anão, o conteúdo de prolina tendeu a aumentar com o incremento da concentração de NaCl até o nível de 150 mM (Bezerra et al., 2001). O nível desse soluto aumenta com a adição de NaCl e com o tempo de exposição das plantas de milho ao sal, sugerindo um papel protetor da prolina

(Rodríguez et al., 1997). O acúmulo de prolina também foi observado em folhas de três genótipos de arroz cultivados na concentração de 100 mM de NaCl (Lima et al., 2004). Lacerda et al. (2003) avaliaram folhas de dois genótipos de sorgo submetidos a 100 mM de NaCl e sugeriram que o acúmulo de prolina ocorre em resposta ao estresse salino, devido ao seu importante papel como osmoprotetor de proteínas e lipídeos.

Popova et al. (2002) mencionam que sob condições salinas muitas plantas acumulam prolina como um osmólito atóxico e protetor. O incremento no teor de prolina parece ter várias funções: ajustamento osmótico, manutenção do pH citoplasmático, proteção contra desnaturação de proteínas, reserva de carbono e nitrogênio, sequestro de radicais livres e como produto de desintoxicação pelo íon amônio. Os solutos compatíveis possuem caráter hidrofílico e atuam não enzimaticamente, como chaperonas de baixo peso molecular, substituindo a água na superfície das proteínas (Hasegawa et al., 2000).

Em geral, a acumulação de prolina está associada a uma redução na concentração de íons tóxicos e a um aumento no volume de água no citosol (Ashraf & Foolad, 2007). A aplicação exógena de prolina pode desempenhar um papel importante no reforço da tolerância das plantas ao estresse salino, na forma de osmoprotetor. A prolina também pode proteger as membranas celulares do estresse oxidativo induzido pelo sal (Ashraf & Foolad, 2007).

De uma maneira geral o teor de proteínas solúveis totais, nos dois genótipos, foi maior nas plantas cultivadas na ausência de NaCl (Figura 3). Uma vez que as plantas cultivadas sob estresse salino apresentaram redução no teor de proteínas e paralelamente ocorreu uma manutenção ou acréscimo no teor de prolina (Figura 2), pode-se inferir que parte do conteúdo endógeno desse iminoácido é resultante de proteólise. Kumar et al. (2008), trabalhando com cultura de calos de pinhão manso na concentração de 100 mM de NaCl e Piza et al. (2003), trabalhando com plantas de abacaxi micropropagadas *in vitro* submetidas a tratamentos com 0,57; 1,15; e 2,30 g. L⁻¹ de NaCl, também observaram redução nos teores de proteínas solúveis totais.

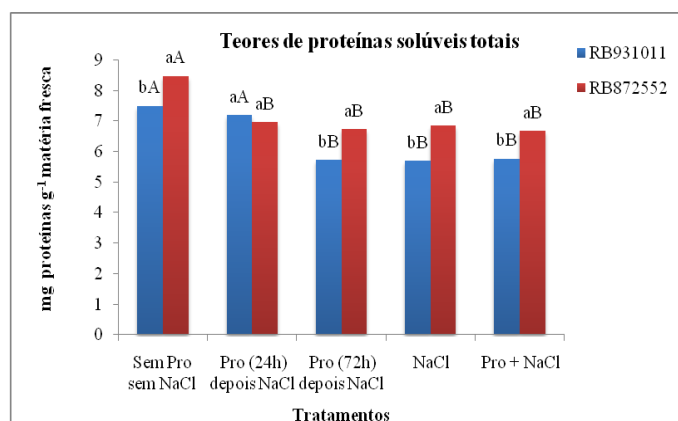


Figura 3. Teores de proteínas solúveis totais em dois genótipos de cana-de-açúcar micropropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo, e minúsculas, no mesmo tratamento, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

O decréscimo no conteúdo de proteína pode refletir retardamento na síntese protéica ou aceleração na sua degradação, levando ao aumento na quantidade de aminoácidos livres, como a prolina, ou à inibição da incorporação destes aminoácidos nas proteínas. A proteólise fornece aminoácidos necessários para a manutenção celular durante distúrbios nutricionais, como os que podem ser causados pela salinidade (Piza et al., 2003).

O estresse salino causa um desequilíbrio nutricional na planta resultando na deficiência de diversos íons e acúmulo de outros, como Na⁺ e Cl⁻ na planta. Foi observado aumento na concentração de Na⁺ nas plantas de todos os tratamentos com NaCl, independente da presença de prolina exógena e do genótipo (Figura 4A). Resultados semelhantes foram encontrados em arroz (Khan & Panda, 2008), em sorgo (Colmer et al., 1996) e em trigo (Mandhania et al., 2006). Apesar de não ter havido diferença entre os genótipos, observou-se que o genótipo RB872552 tendeu a apresentar maiores teores de Na⁺ nos tratamentos com NaCl (Figura 4A).

A absorção de íons ocorre através de canais iônicos e de transportadores que são, ambos, proteínas que se localizam nas membranas plasmáticas. Como não existem transportadores específicos de Na⁺, esse cátion é absorvido por competição através de carregadores de K⁺ e Ca²⁺ (Mässer et al., 2002). A similaridade entre o raio iônico hidratado

do sódio e do potássio torna difícil a discriminação entre esses dois cátions pelas proteínas transportadoras. Já foram descritas seis famílias de genes relacionadas ao transporte de K^+ e, dentre essas, quatro famílias são fortes candidatas a transportadores de Na^+ . O Na^+ pode também ser absorvido por meio de canais de cátion de baixa afinidade, os chamados canais não seletivos. (Mässer et al., 2002).

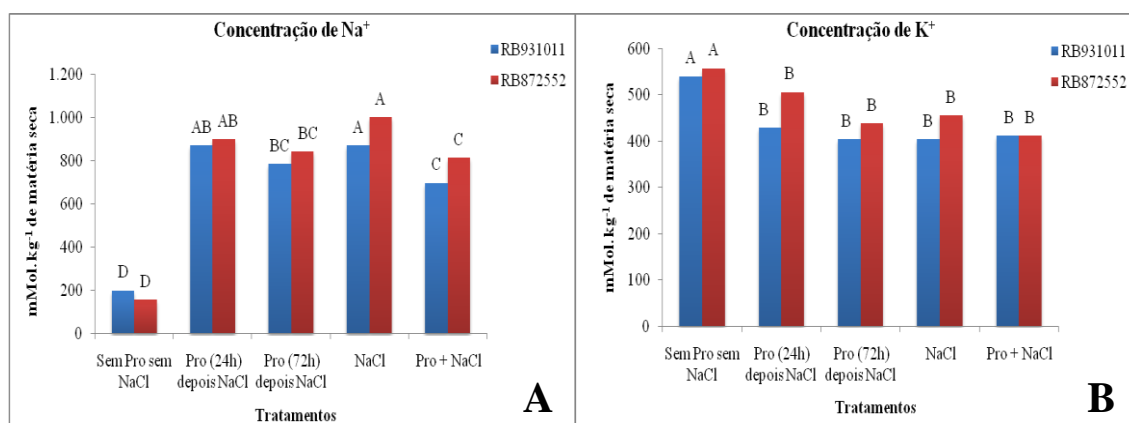


Figura 4. Mudanças nas concentrações de A- Na^+ e B- K^+ em dois genótipos de cana-de-açúcar micropropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Ao nível celular, deve ser evitado o acúmulo de Na^+ no citosol, onde se encontra o aparato metabólico sensível, tanto em glicófitas como em halófitas. Quando o limite de 100 mM de Na^+ é ultrapassado o sal deve ser excluído do citosol para fora da célula através do transporte ativo ou pela compartimentalização vacuolar, para evitar a inibição de um grande número de enzimas (Munns, 1993).

Em altas condições de salinidade, as plantas mantêm geralmente elevadas concentrações de Na^+ e baixas concentrações de K^+ no citosol (Taiz & Zeiger, 2004). O K^+ está envolvido no balanço de cargas no citoplasma, contrabalançando as cargas negativas de algumas proteínas e ácidos nucleicos; é ativador de reações enzimáticas vitais; contribui significativamente para a manutenção do potencial osmótico do vacúolo e turgor celular e, é essencial na síntese de proteínas (Tester & Davenport, 2003).

Nos dois genótipos de cana-de-açúcar foi verificada uma redução da concentração de potássio em todos os tratamentos submetidos ao estresse salino quando comparado ao grupo

controle (Figura 4B). No genótipo RB872552 os teores de K^+ em todos os tratamentos, inclusive no controle, foram superiores aos do genótipo RB931011, sugerindo que esse maior teor é uma característica constitutiva deste genótipo (Figura 4B).

Azevedo-Neto & Tabosa (2000) destacam que o aumento nas concentrações de Na^+ com concomitante redução nas concentrações de K^+ aumenta excessivamente as relações Na^+/K^+ em milho. Isto foi ratificado nesse estudo, sendo observado, nos dois genótipos, um elevado aumento dessa relação nos tratamentos que receberam NaCl (Figura 5). O aumento dessa relação também foi observada por Kumar et al. (2008), em *Jatropha curcas* L. sob estresse salino de 20 a 100 mM de NaCl e por Khan e Panda (2008), em folhas de dois genótipos de arroz submetidos a 50, 100 e 150 mM de NaCl. Mesmo apresentando menores teores de K^+ , o genótipo RB931011 manteve a relação Na^+/K^+ (1,66) estatisticamente igual à relação do genótipo RB872552 (1,62) (Figura 5), sugerindo uma melhor aclimação do primeiro genótipo à salinidade.

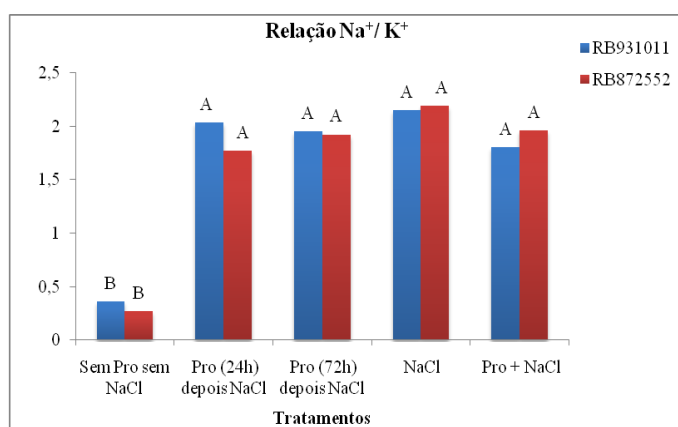


Figura 5. Mudanças na relação Na^+/K^+ em dois genótipos de cana-de-açúcar micropropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A atividade das enzimas CAT, POD, APX e PPO aumentou significativamente em função do incremento da salinidade. De um modo geral, a atividade dessas enzimas antioxidativas aumenta sob estresse salino (Mittova et al., 2003). Elas têm um importante papel na eliminação das ROS (radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio singlete) produzidas pelo estresse oxidativo. As ROS causam uma variedade de

danos às biomoléculas como DNA, pigmentos fotossintéticos, lipídeos, proteínas e carboidratos. Esses danos se traduzem em diversos processos degenerativos incluindo peroxidação de lipídeos de membrana e morte celular programada (Silveira et al., 2001; Sairan et al., 2002). As ROS podem também induzir hipo ou hipermetilação do DNA, deleção e substituição de bases do DNA, alterações cromossômicas (aneuploidias e poliploidias) e rearranjo cromossômico (Cassells & Cury, 2001).

A relação positiva entre a capacidade antioxidativa e a tolerância ao NaCl vem sendo demonstrada em várias espécies de plantas (Madhania et al., 2006). Vários autores relatam uma maior atividade enzimática nas cultivares mais tolerantes do que nas mais sensíveis em culturas como trigo (Sairan et al., 2002), amora (Sundhakar et al., 2001), milho (Sreenivasulu et al., 1999) e algodão (Meloni et al., 2003).

A primeira enzima a atuar na eliminação de ROS é a superóxido dismutase (SOD) convertendo o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse produto tóxico da SOD é eliminado pela CAT e pela APX, esta última enzima age em conjunto com a glutatona redutase (GR) sendo este sistema mais eficiente do que a CAT. A atividade da CAT e da APX não é redundante, a atuação dessas enzimas pode servir de zona de tampão para controlar a superprodução de ROS que atinge distintos compartimentos celulares durante as situações de estresse (Willekens et al., 1997; Mittler, 2002).

Observou-se um incremento da CAT em função da presença de NaCl no meio de cultura em ambos os genótipos. O genótipo RB931011, entretanto, apresentou maior incremento na atividade desta enzima do que o genótipo RB872552 (Figura 6A). Genótipos de amora mais tolerantes ao estresse salino apresentam maior incremento na atividade da CAT do que os genótipos sensíveis à salinidade (Sundhakar et al., 2001). Sairan et al. (2002) também observaram maior atividade desta enzima nos genótipos de trigo tolerantes ao estresse salino e sugeriram que a elevada atividade da CAT tem um papel importante, conferindo tolerância às cultivares. Resultados similares foram encontrados por Agarwal &

Pandey (2004), que verificaram aumento da CAT em plântulas de *Cassia angustifolia* L. submetidas a 20, 50 e 100 mM de NaCl. Incremento na atividade da CAT também foi constatado em folhas de arroz de genótipos tolerantes à salinidade (Lima, 2008).

A CAT, uma das mais eficientes enzimas que existe (Koolman & Roehm, 2005), está entre as de maior importância na regulação dos níveis intracelulares de H_2O_2 (Noctor & Foyer, 1998). Uma única molécula de CAT pode converter mais de 100 milhões de moléculas de H_2O_2 /segundo, produzindo H_2O e O_2 . Esta enzima está localizada em peroxissomos, glioxissomos e organelas relacionadas, onde enzimas oxidativas, produtoras de H_2O_2 , estão presentes (Koolman & Roehm, 2005).

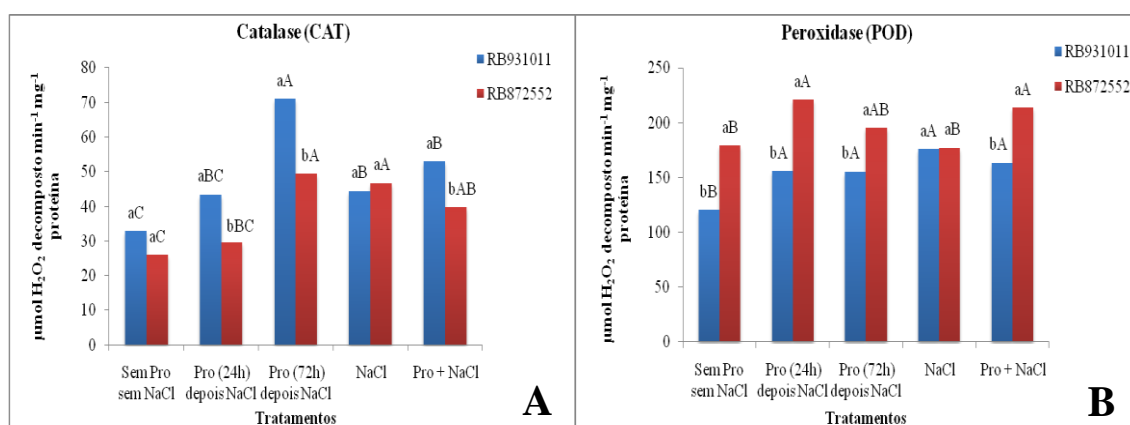


Figura 6. A- Atividade da CAT e B- Atividade da POD em dois genótipos de cana-de-açúcar micropropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo, e minúsculas, no mesmo tratamento, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

O NaCl incorporado ao meio de cultivo resultou num incremento da atividade da POD no genótipo RB931011, independente da presença de prolina. No genótipo RB872552, entretanto, foi observado uma maior atividade desta enzima, inclusive nas plantas do tratamento controle, indicando que essa maior atividade é uma característica constitutiva deste genótipo. Por outro lado as plantas desse genótipo RB872552, quando submetidas ao NaCl exclusivamente e ao pré-tratamento com 72 horas de prolina, mantiveram a atividade da POD similar ao controle (Figura 6B). Meloni et al. (2003), observaram em algodão que a cultivar sensível não apresentou diferença na atividade da POD em função do estresse salino (50, 100 e 200 mol. m⁻³ NaCl) enquanto que no genótipo tolerante a atividade enzimática foi

aumentada. Mandhania et al. (2006), também verificaram aumento da atividade da POD em genótipo de trigo tolerante à salinidade quando submetidos a 50 e 100 mM de NaCl. Khan e Panda (2008), em estudo com duas cultivares de arroz, constataram que a atividade da POD aumenta no genótipo tolerante tratado nas concentrações de 50, 100 e 150 mM de NaCl.

O incremento da atividade da POD é fundamental para o sequestro do H_2O_2 uma vez que o acúmulo desta espécie reativa pode resultar no aumento da citotoxicidade pela formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 na reação de Haber-Weiss (Gossett et al., 1994; Meloni et al., 2003). As peroxidases são óxido-redutases capazes de catalisar a transferência do hidrogênio de doadores de elétrons de natureza fenólica para o H_2O_2 , formando moléculas de água. Em plantas, essa ação constitui uma proteção antioxidativa (Bor et al., 2003). Essa enzima localiza-se, principalmente, na parede celular e nos vacúolos das células de plantas superiores, podendo sua localização variar de acordo com a idade, espécie e grau de diferenciação (Radic et al., 2006).

No que se refere à atividade da APX as plantas de ambos os genótipos apresentaram incremento quando submetidas ao estresse salino. Observou-se uma tendência do genótipo RB931011 a apresentar maior aumento da atividade desta enzima nos tratamentos com prolina (Figura 7A). Trabalhos realizados com trigo destacaram maior atividade da APX nas cultivares de trigo tolerantes à salinidade (Sairan et al., 2002; Madhania et al., 2006). Heidari (2009) observou que dois genótipos de sorgo toleraram as concentração de 100 e 200 mM de NaCl devido, principalmente, ao aumento da atividade enzimática antioxidante, incluindo o aumento da APX. A atividade da APX é uma rota chave de tolerância de citros em resposta ao estresse salino, comparando a resposta dessa enzima em plantas tolerantes e sensíveis ao sal (Gueta-Dahan et al., 1997).

A APX caracteriza-se por possuir uma elevada especificidade pelo ascorbato, sendo a enzima responsável pela eliminação do poder tóxico do H_2O_2 , no cloroplasto e citosol, das células vegetais (Asada, 1992). APX e CAT pertencem a duas classes diferentes de enzimas

em função das suas afinidades ao H_2O_2 . A APX é de ordem micromolar e a CAT, milimolar. Assim, enquanto a APX pode ser responsável por uma fina modulação da resposta às ROS, a CAT é provavelmente responsável pela remoção do excesso de ROS durante o estresse (Mittler, 2002). Aparentemente as catalases estão ausentes nos cloroplastos, dessa forma a detoxificação da H_2O_2 nesta organela é realizada pelo ciclo ascorbato-glutationa (Asada, 1992) numa reação catalisada pela enzima ascorbato peroxidase (Chen & Asada, 1989).

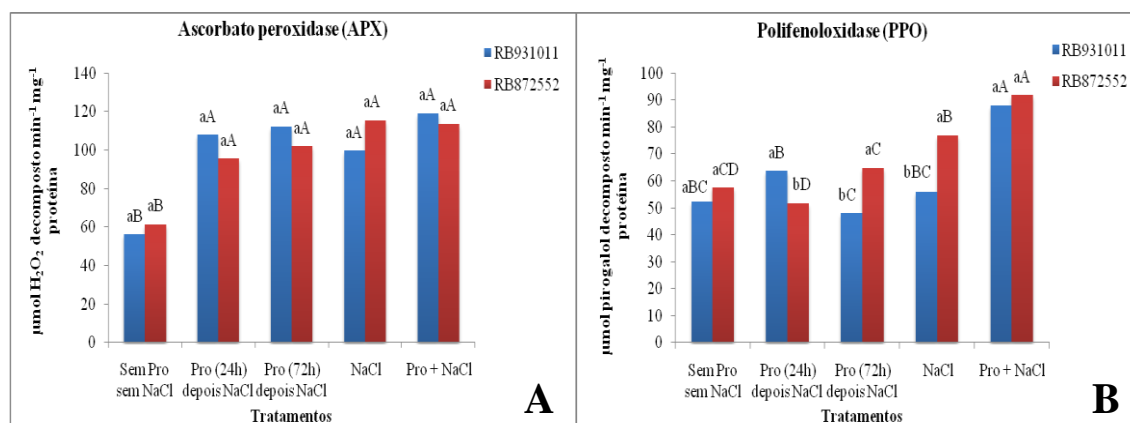


Figura 7. A- Atividade da APX e B- Atividade da PPO em dois genótipos de cana-de-açúcar micropropagados *in vitro* em meio MS com ou sem 20 mM de prolina e 100 mM de NaCl. Letras iguais maiúsculas, no mesmo genótipo, e minúsculas, no mesmo tratamento, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Quanto à atividade da PPO, a imersão prévia das plantas em prolina exógena não promoveu aumento da atividade enzimática em nenhum dos genótipos, enquanto que a presença do NaCl (sem prolina exógena) provocou incremento significativo apenas no genótipo RB872552. A adição de prolina e NaCl ao meio de cultura resultou no aumento da atividade da PPO em ambos os genótipos (Figura 7B). O aumento da PPO em tratamentos com NaCl já tinha sido registrado por Agarwal & Pandey (2004) em folhas de *Cassia angustifolia*, em plântulas de feijão por Demir & Kocaçaliskan (2001) e em folhas de *Momordica charantia* L. por Agarwal & Shaheen (2007).

As polifenoloxidasas são monooxigenases do grupo das óxido-redutases que contêm cobre em sua estrutura e que se localizam nas membranas celulares, nas quais se encontram inativas, tornando-se ativas quando liberadas. As PPO promovem a oxidação enzimática de compostos fenólicos produzindo, inicialmente, quinona que rapidamente se polimerizam,

formando pigmentos insolúveis e escuros denominados melanina, ou reagem não-enzimaticamente com aminoácidos, proteínas ou outros compostos (Marri et al., 2003).

O cultivo de plantas em condições de salinidade pode causar estresse e induzir alterações metabólicas. Muitos trabalhos têm mostrado resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo, relacionados ao aumento da atividade das enzimas sob estresse salino. Entretanto, pouco se conhece sobre o uso da prolina exógena e o aumento do sistema de defesa enzimático. Observou-se que as plantas de cana-de-açúcar, de ambos os genótipos, apresentaram maiores conteúdos de prolina nos tratamentos ao qual se adicionou prolina ao meio de cultivo e no tratamento em que as plantas foram pré-tratadas com prolina durante 72 horas antes da inoculação em meio salino (figura 2).

Nas plantas cultivadas com prolina no meio de cultivo o incremento da prolina endógena nos tecidos foi acompanhado pelo incremento da atividade da PPO, em ambos os genótipos, e da POD no genótipo RB872552, quando comparado ao tratamento apenas com NaCl. O aumento da atividade da CAT e da APX, entretanto, não diferiu estatisticamente entre esses tratamentos (figuras 6 e 7). Hoque et al. (2007) avaliaram o efeito da aplicação de prolina em células de tabaco e constataram que a atividade da CAT e da POD aumentaram significativamente nas plantas do tratamento que apresentava prolina associada ao NaCl quando comparadas ao tratamento suplementado apenas com NaCl. Paleg et al. (1984), averiguaram que a atividade das enzimas CAT, POD e PPO foram promovidas pela prolina. Ozden et al. (2008), demonstraram que a atividade da APX e da POD foi aumentada com a aplicação de prolina em folhas de videira submetidas ao estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 .

Existem, entretanto, diferentes níveis de aclimação entre plantas, inclusive, da mesma espécie. Em cana-de-açúcar, cultura moderadamente sensível à salinidade, têm sido relatadas diferenças no grau de tolerância à salinidade entre os diversos genótipos (Garcia & Medina, 2003). A maior integridade da membrana apresentada pelo genótipo RB931011 neste

trabalho reflete um baixo nível de peroxidação dos lipídeos provocados pelas ROS. A peroxidação lipídica causa alteração na estrutura e funcionamento da membrana plasmática, podendo ocorrer vazamento do conteúdo celular, desidratação rápida e morte da célula (Neves, 2003).

Genótipos que apresentam aumento nos teores de prolina endógena e na atividade das enzimas antioxidativas têm alta capacidade de eliminar as ROS produzidas pelo estresse oxidativo. Essa maior capacidade de eliminação das ROS no genótipo RB931011 é função da habilidade em incrementar a atividade da POD nas plantas submetidas a todos os tratamentos salinos, da tendência ao maior incremento da atividade da APX e da CAT quando comparado ao genótipo RB872552. Paralelamente, foi observado que os teores de Na^+ e K^+ foram maiores no genótipo RB872552; porém, o genótipo RB931011, mesmo apresentando menores teores de K^+ , manteve a relação Na^+/K^+ estatisticamente igual ao outro genótipo.

O presente estudo sugere que a suplementação de prolina exógena no meio de cultivo *in vitro* é capaz de efetivamente reforçar a atividade das enzimas antioxidativas. A elevada atividade das enzimas e o incremento nos teores de prolina endógena sob estresse salino indicam a existência de uma relação positiva entre aclimação à salinidade e o sistema de defesa antioxidante.

Como constatado por diversos pesquisadores fica evidente que a aclimação ao estresse salino não é definida por um único parâmetro e sim pela combinação de diversos caracteres. A alta atividade antioxidante, que resulta em um baixo estresse oxidativo, a elevada concentração de osmólitos, a absorção seletiva de íons úteis e a prevenção do acúmulo de íons tóxicos contribuem para a melhor aclimação de genótipos de cana-de-açúcar. De tal modo, os resultados confirmam, pelos parâmetros analisados, uma correlação entre sistema de defesa e tolerância a salinidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor, ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pelo fornecimento do material vegetal e ao técnico do laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Francisco Wellington de Oliveira Carneiro pelo apoio na realização das análises bioquímicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S.; PANDEY, V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v.48, p.555-560, 2004.

AGARWAL, S.; SHAHEEN, R. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p. 149-161, 2007.

ASADA, K. Ascorbato peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiology Plant**, v. 85, p. 235-241, 1992.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant biotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206–216, 2007.

AZEVEDO, I. G.; OLIVEIRA, J. G.; DA SILVA, M. G.; PEREIRA, T.; CORRÊA, S. F.; VARGAS, H.; FAÇANHA, A. R. P-type H⁺-ATPases activity, membrane integrity and apoplastic pH during papaya fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 42-247, 2008.

AZEVEDO-NETO, A. D.; TABOSA, J. N. Estresse salino em plântulas de milho: II. Distribuição dos macronutrientes catiônicos e suas relações com sódio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, p. 165-171, 2000.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**. v. 39, p. 205–207, 1973.

BERRS, L.S.J.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 133-140, 1952.

BEZERRA, J.S.; WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Crescimento de calos embriogênicos de milho submetidos ao estresse salino. **Scientia Agrícola**, v.58, p. 259-263, 2001.

BEZERRA-NETO, E.; BARRETO, L.P. **Métodos de análise químicas em plantas**. Recife: Imprensa universitária, *UFRPE*, 2004, 148p.

BOR, M.; OZDEMIR, F.; TURKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, v. 164, p. 77–84, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

CASSELLS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 145-157, 2001.

CHEN, G.X.; ASADA, K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isoenzymes and their differences in enzymatic and molecular properties. **Plant Cell Physiol**, v. 30, p. 987-998, 1989.

COLMER, T.D.; FAN, T.W.M.; HIGASHI, R.M.; LÄUCHLI, A. Interactive effects of Ca^{2+} and NaCl stress on the ionic relations and proline accumulation in the primary root tip of *Sorghum bicolor*. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 421-424, 1996.

DEMIR, Y.; KOCAÇALISKAN, I. Effects of NaCl and proline on polyphenol oxidase activity in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.) grown by embryo culture. **Biologia Plantarum**, v.44, p.607–609, 2001.

ESTEVEES, B.S.; SUZUKI, M.S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 662-679, 2008.

FATIBELHO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v.25, p.455-464, 2002.

GARCÍA, M.; MEDINA, E. Crecimiento y acumulación de prolina en dos genotipos de caña de azúcar sometidos a salinización con cloruro de sodio. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v.20, p.168-179, 2003.

GOSSET, D.R.; MILLHOLLON, E.P.; LUCAS, M.C. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. **Crop Science**, v. 34, p. 706-714, 1994.

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**, v. 203, p. 460-469, 1997.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BONNERT, H.J. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.463-99, 2000.

HEIDARI, M. Antioxidant activity and osmolyte concentration of sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*) genotypes under salinity stress. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 240-244, 2009.

- HOQUE, M.A.; OKUMA, E.; BANU, M.N.A.; NAKAMURA, Y.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 553-561, 2007.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during pice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.
- KHAN, M.H.; PANDA, S.K. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. **Acta Physiol Plant**, v. 30, p. 81-89, 2008.
- KOOLMAN, J.; ROEHM, K.H. **Bioquímica-texto e atlas**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 478p.
- KUMAR, N.; PAMIDIMARRI, S.D.V.N.; KAUR, M.; BORICHA, G.; REDDY, M.P. Effects of NaCl on growth, ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus cultures of *Jatropha curcas*. **Biologia**, v. 63, p. 378-382, 2008.
- LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A.; RUIZ, H.A.; PRISCO, J.T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 107-120, 2003.
- LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant and Cell Environment**, v.25, p.275-294, 2002.
- LIMA, M.G.S. detecção de genes e expressão enzimática em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) crescidas sob estresse sal. Pelotas: UFP/IB, 2008. 93p. (Livre-Docência)
- LIMA, M.G.S.; LOPES, N.F.; BACARIN, M.A.; MENDES, C.R. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. **Bragantia**, v. 63, p.335-340, 2004.
- LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J.M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 450-458, 1999.
- MANDHANIA, S.; MADAN, S.; SAWHNEY, V. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 50, p. 227-231, 2006.
- MANSOUR, M.M.F.; SALAMA, K.H.A. Cellular basis of salinity tolerance in plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 113-122, 2004.
- MARRI, C.; FRAZZOLI, A.; HOCHKOEPLER, A.; POGGI, V. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Phytochemistry**, v. 63, p. 745-752, 2003.
- MÄSSER, P.; GIERTH, M.; SCHROEDER, J.I. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. **Plant and Soil**, v. 247, p. 43-54, 2002.

MELONI, D.A.; OLIVA, M.A.; MARTINEZ, C.A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 69–76, 2003.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MITTOVA, V.; TAL, M.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 845–856, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUNNS, R. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. **Plant Cell Environment**, v.16, p.15-24, 1993.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.

NEVES, L.M. Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 72p.

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

OZDEN, M.; DEMIREL,U.; KAHRAMAN, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. **Scientia Horticulturae**, v. 3041, 6 p., 2008.

PALEG, L.G., STEWARD, G.R.; BRADBEER, J.W. Proline and glycine betaine influence protein solvation. **Plant Physiology**, v. 75, p. 974-978, 1984.

PANDA, S.K.; UPADHYAY, R.K. Salt stress injury induces oxidative alteration and antioxidative defence in the roots of *Lemna minor*. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 249-253, 2003.

PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, p. 361-366, 2003.

POPOVA, O.V.; ISMAILOV, S.F.; POPOVA, T.N.; DIETZ, K.J.; GOLLDACK, D. Salt-induced expression of NADP dependent isocitrate dehydrogenase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in *Mesembryanthemum crystallinum*. **Planta**, v. 215, p. 906-913, 2002.

RADIC, S.; RADIC-STOJKOVIC, M.; PEVALEK-KOZLINAB. Influence of NaCl and manitol on peroxidases activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. **Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 1284-1292, 2006.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1189-1202, 2004.

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Boletim Técnico de Lançamento de novas variedades RB de Cana-de-açúcar**. (Eds: SIMÕES-NETO, D.E.; MELO, L.J.O.; CHAVES, A.; LIMA, R.O.R.). Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 2005. 28p. (Boletim Técnico N° 1).

RODRÍGUEZ, H.G.; ROBERTS, J.K.M.; JORDAN, W.R.; DREW, M.C. Growth, water relation, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. **Plant Physiology**, v. 113, p. 881-893, 1997.

SACILOTO, R.F.Z. Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala*. Piracicaba: USP/ESALQ, 2003. 74 p. (Livre Docência).

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*, v. 163, p. 1037-1046, 2002.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, p. 71-78, 2002.

SILVEIRA, J.A.G.; MELO, A.R.B.; VIÉGAS, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Salt-induced effects on the nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, p. 171-179, 2001.

SOUZA, G.M.; SILVA, A.M. Desvendando as vias de transdução de sinal da cana-de-açúcar. **Biociência**, v.25, p. 58-63, 2002.

SREENIVASULU, N.; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRAKINI, K.; PRAKASH, H. S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H.S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. **Plant Science**, v.141, p.1-9, 1999.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v. 161, p. 613-619, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED Editora S.A., 2004, 363p.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Ann. Bot.**, v. 91, p. 503-527, 2003.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VANMONTAGU, M.; INZÉ, D.; VANCAMP, W. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. **EMBO Journal**, v. 16, p. 4806-4816, 1997.

WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, v.1, p. 207-228, 1995.

ZERAIK, A.E.; SOUZA, F.S.; FATIBELHO-FILHO, O.; LEITE, O.D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, p. 731-734, 2008.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- O estresse salino diminuiu a porcentagem de integridade de membrana promovendo maior extravasamento de eletrólitos nos tratamentos salinos, independente da aplicação da prolina exógena;
- Os teores de proteínas solúveis totais diminuíram em função da adição do NaCl nos dois genótipos; paralelamente, o conteúdo de prolina endógena aumentou em decorrência do estresse salino;
- A concentração de Na⁺ foi mais alta no genótipo RB872552 e a de K⁺ foi mais baixa no genótipo RB931011, entretanto, ambos apresentaram elevada relação Na⁺/K⁺;
- A atividade das enzimáticas CAT, POD, APX e PPO foram aumentadas pela aplicação da prolina exógena ao meio de cultivo em ambos os genótipos;
- O genótipo RB931011 destacou-se por apresentar maiores teores de prolina endógena e maior ativação das enzimas antioxidantes.

ANEXO

**INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO A REVISTA SCIENTIA
AGRICOLA**

INSTRUÇÕES GERAIS

Originais: uma via e um CD com texto e ilustrações

Língua: Inglês

Processador de texto: Word for Windows

Espaçamento do texto: duplo, margens laterais de três centímetros

Papel: formato A4, com linhas numeradas

Fonte: Times New Roman, tamanho 12

Número de páginas: até 30 páginas, numeradas consecutivamente, incluindo as ilustrações

Apresentação da página de rosto

- a. título do artigo (máximo de 15 palavras)
- b. nome(s) do(s) autor(es), indicar com asterisco o autor correspondente
- c. filiação científica do(s) autor(es), mencionando Instituição/Departamento/Seção
- d. e-mail do autor correspondente

Apresentação da estrutura do artigo

Não colocar nomes dos autores.

- a. Título em inglês, abstract (no máximo 250 palavras) e key words (máximo de cinco)
- b. Título, Resumo e Palavras-chave
- c. Introdução (contendo revisão de literatura) máximo 25 linhas
- d. Material e Métodos
- e. Resultados e Discussão
- f. Conclusões (opcional)
- g. Agradecimentos
- h. Referências Bibliográficas
- i. O Título, Resumo e Palavras-chave deverão também ser feitos em português

Citações do texto

- a. as citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação
- b. no caso de dois autores, usar & ("e" comercial)
- c. havendo mais de dois autores, é citado apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al. (não itálico)
- d. Não serão aceitas citações de comunicações pessoais e artigos no

prelo.

Referências bibliográficas

As referências são normalizadas segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (NBR 6023). Devem ser apresentadas em:

- ordem alfabética pelo sobrenome do autor
- dois ou mais autores, separar por (;)
- os títulos dos periódicos não devem ser abreviados

Artigos de periódicos

WULFF, N.A.; PASCHOLATTI, S.F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, v.55, p.138-143, 1998.

Publicados online: ALMEIDA, F.T.; BERNARDO, S.; SOUSA, E.F.; MARTINS, S.L.D.; GRIPPA, S. Growth and yield of papaya under irrigation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, p.419-424, 2003. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=0103-901620030003&lng=pt&nrm=iso. Accessed 04 Sept. 2003.

Livros

PINDYK, R.S.; RUBINFELD, D.L. **Econometric models and economic forecasts**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1991. 596p.

Capítulos de livros

FRIED, W.M.; WARNER, J.R. Organization and expression of eukaryotic ribosomal protein genes. In: STEIN, G.S.; STEIN, J.L., (Ed.) **Recombinant DNA and cell proliferation**. Orlando: Academic Press, 1984. cap.1, p.169-192.

Eventos (considerados em parte)

CHANDRA, S. Tropical crop statistic: a world perspective. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 6., Lima, 1983. **Proceedings**. Lima: International Potato Center, 1984. p.41-46.

Teses e Dissertações

ZUCCHI, R.A. Taxonomia de espécie de *Trichogramma* (*Hym. Trichogrammatidae*) associada a algumas pragas (Lepidoptera) no Brasil. Piracicaba: USP/ESALQ, 1985. 77p. (Livre-Docência).

Citação de resumo

DAHM, H. Metabolic activity of bacteria isolated from soil, rhizosphere and

mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestres* L.). **Acta Microbiologica Polonica**, v.33, n. 2, p.157-162, 1984. / Resumo 294 em **Soils and Fertilizers**, v.48, p.33, 1985/.

Tabelas e figuras

Tabelas: Numeradas com algarismos arábicos, devem ser apresentadas no módulo tabela do MS Word ou MS Excel. O título deve ficar acima.

Figuras/Gráficos: Numeradas com algarismos arábicos, devem ser apresentadas em MS Excel. O título deve ficar abaixo.

Fotografias: Devem ser fornecidas no formato tif (300DPI) e também no formato original em papel fotográfico. Fotografias aparecerão como figuras no formato final do artigo e seguirão a numeração das figuras.

Informações Complementares

- A nomenclatura científica deve ser citada segundo os critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais em cada área.
- Unidades e Medidas devem seguir o Sistema Internacional.
- Os conceitos e opiniões contidos nos artigos são de exclusiva responsabilidade dos autores.

Encaminhamento de artigos

Na carta de encaminhamento do manuscrito deverão constar a assinatura, o CPF e o endereço eletrônico de todos os autores, mais o endereço postal e telefone do autor correspondente.

Encaminhar para USP / ESALQ / SCIENTIA AGRICOLA, Prof. Luís Reynaldo F. Alleoni - Editor Chefe. Av. Pádua Dias, 11. Caixa Postal 913418-900. Piracicaba-SP, Brasil.Tel.: (19) 3429-4401 / 3429-4486 Fax: (19) 3429-4401