

MANUELA MARIA CAVALCANTE GRANJA

**RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO À INDUÇÃO DO
ESTRESSE GRADATIVO E CHOQUE OSMÓTICO PELO NaCl EM
CANA-DE-AÇÚCAR**

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

**RECIFE
FEVEREIRO – 2010**

**RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO À INDUÇÃO DO
ESTRESSE GRADATIVO E CHOQUE OSMÓTICO PELO NaCl EM
CANA-DE-AÇÚCAR**

MANUELA MARIA CAVALCANTE GRANJA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof^ª. Dr^ª. Terezinha Camara

Prof^ª. Dr^ª. Lilia Willadino

**RECIFE
FEVEREIRO – 2010**

**RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO À INDUÇÃO DO
ESTRESSE GRADATIVO E CHOQUE OSMÓTICO PELO NaCl EM
CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____ de Fevereiro de 2010

ORIENTADORA:

Dsc. Terezinha Rangel Camara
Professora do Departamento de Química/UFRPE

BANCA EXAMINADORA

Dsc. Claudia Ulisses de Carvalho Silva
Professora da Unidade Acadêmica de Garanhuns /UFRPE

Dsc. Péricles de Albuquerque Melo Filho
Professor do Departamento de Agronomia/UFRPE

Dsc. Reginaldo de Carvalho
Professor do Departamento de Biologia/UFRPE

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2010**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente *Àquele* que me guia e que me protege em toda a minha caminhada. *Àquele* que me dá força e coragem para conquistar os meus objetivos e sonhos, Deus.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) por poder participar do programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas para a obtenção do grau de Mestre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas para o Nordeste (CETENE) pela concessão do material vegetal utilizado no estudo

À minha família, *Junior, Delma, Nathalia, Vô Granja e Tia Ana*. São neles que eu encontro o conforto de um colo protetor, a sapiência das palavras ditas e os gestos de afetos mais doces.

A Dsc. *Terezinha Camara*, pela orientação, por ter “aberto portas”, confiança, amizade, apoio e valiosos ensinamentos, que me proporcionaram crescer como profissional e pessoa. Sou muito grata!

A Dsc. *Lilia Willadino*, pela co-orientação, ensinamentos, amizade e auxílio na elaboração do trabalho.

A *Well*, pelos momentos descontraídos, amizade e pela preciosa ajuda na execução das análises, meu braço direito!

Aos Dsc. *André Dias Azevedo Neto, Gilberto Junior e Manoel Bandeira* pela ajuda na compreensão das análises e simpatia.

Ao Dsc. *Péricles Melo Filho* e Dsc. *Roseane dos Santos*, por todos os ensinamentos, conselhos e amizade.

Aos membros da banca examinadora: Dsc. *Claudia Ulisses*, Dsc. *Ana Porto*, Dsc. *Péricles Melo Filho* e Dsc. *Reginaldo de Carvalho*, pela amizade, atenção e conhecimentos transmitidos ao longo desses anos.

Aos professores do Programa de melhoramento Genético de Plantas, em especial ao Dsc. *Clodoaldo Filho*, Dsc. *Gerson Bastos*, Dsc. *Edson da Silva*, Dsc. *Vivian Loges*, pela transmissão de conhecimentos e atenção.

À secretária da fitotecnia *Bernadete*, pela efetividade, atenção e amizade.

À amiga *Lucilia*, uma pessoa especial que admiro muito! Por tantos conselhos, incentivos, força, momentos felizes e amizade sincera.

Aos amigos da minha segunda casa, Laboratório de cultura de tecidos vegetais (LCTV), por tantos momentos compartilhados, pela amizade, ajuda, cumplicidade e partilha de aprendizagem. Sucesso a todos: *Luciana, Jaislanny, Marina, Silvany, Ronaldo, João, Emmanuel, Vitor, Gilvany, Gemima, Patrícia Cunha e Vanessa*.

Aos meus queridos amigos, *Gisele, Taline, Renato, Tatiana e Lucas*. Obrigada pelo apoio, amizade e pelos momentos únicos vividos.

Aos meus queridos amigos da melhor turma de mestrado: *Jacqueline, Isabel, Eva, Jaislanny, Marina, Paula, João, Júlio, Rômulo e Romero*, que depois de tantos momentos, viagens, madrugadas de estudo, conseguimos conquistar o nosso sonho, nos tornar Melhoristas!

Muito Obrigada!

*A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

SUMÁRIO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	X
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO GERAL	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1. CANA-DE-AÇÚCAR	18
2. ESTRESSE AMBIENTAL	19
3. SALINIDADE DOS SOLOS	20
4. EFEITO DA SALINIDADE SOBRE O DESENVOLVIMENTO, CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO DAS PLANTAS	21
5. ESTRESSE OXIDATIVO COMO RESPOSTA À SALINIDADE	25
6. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA DAS PLANTAS AO ESTRESSE SALINO	27
OBJETIVO GERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
MANUSCRITO	37
ABSTRACT	38
RESUMO	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	66
AGRADECIMENTOS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Atividade da CAT e POX em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas <i>in vitro</i> sob dois níveis de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM de NaCl). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.	47
Figura 2. Atividade da CAT, POX E APX em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas <i>in vitro</i> em resposta à condição de aplicação (Gradativa ou Choque) do estresse salino. Letras idênticas, maiúsculas entre variedades e minúsculas entre condição de aplicação do estresse, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	51
Figura 3. Atividade da APX e PPO em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas <i>in vitro</i> sob duas concentrações de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM). Letras idênticas, maiúsculas entre variedades e minúsculas entre os níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	52
Figura 4. Atividade da PPO de duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas <i>in vitro</i> em resposta à concentração de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM) e à condição de aplicação (Gradativa ou Choque) do estresse salino. Letras idênticas, maiúsculas entre as condições de indução do estresse salino e minúsculas entre os níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	54
Figura 5. Teor de proteínas solúveis e prolina em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas <i>in vitro</i> sob dois níveis de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM de NaCl). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.	56
Figura 6. Teor de proteínas solúveis em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas <i>in vitro</i> sob duas concentrações de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM) e condições do estresse salino. Letras idênticas, maiúsculas entre variedades ou condição do	56

estresse e minúsculas entre os níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 7. Concentração dos íons Na^+ e K^+ e relação Na^+/K^+ em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de NaCl. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%. **59**

Figura 8. Teor de Na^+ e relação Na^+/K^+ em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob diferentes formas de indução do estresse salino. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. **60**

Figura 9. Teor de K^+ em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob estresse salino. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. **61**

Figura 10. Teores de Na^+ , K^+ e Na^+/K^+ de duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* em resposta à concentração ($\text{T1} = 56 \text{ mM}$ e $\text{T2} = 112 \text{ mM}$ de NaCl) e à condição de aplicação (Gradativa ou Choque) do estresse salino. Letras idênticas, maiúsculas entre as condições de indução do estresse salino e minúsculas entre os níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **63**

Figura 11. Relação Na^+/K^+ em duas variedades de cana-de-açúcar (RB930100 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob dois tratamentos salinos ($\text{T1} = 56 \text{ mM}$ e $\text{T2} = 112 \text{ mM}$). Letras idênticas, maiúsculas entre variedades e minúsculas entre níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **64**

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Descrição do acréscimo de NaCl no estabelecimento dos tratamentos ao longo do período experimental	42

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea considerada moderadamente sensível à salinidade. Embora tradicionalmente cultivada nas zonas de Mata úmida e Litoral da região Nordeste, o cultivo da cana-de-açúcar vem se expandindo também para regiões semi-áridas. A má qualidade da água de irrigação, altas taxas de evaporação e baixa precipitação pluviométrica, aliada a outros fatores contribuem para o processo de salinização dos solos do semi-árido. Para o desenvolvimento e seleção de genótipos tolerantes, é necessário conhecer os mecanismos fisiológicos com os quais as plantas enfrentam o estresse salino. Técnicas de cultivo *in vitro* para estudos da fisiologia e bioquímica de plantas, em condições de estresse, são importantes ferramentas por permitirem o controle e homogeneidade das condições de cultivo. No presente trabalho, dois genótipos de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar da RIDESA, para a região Nordeste, foram submetidos ao estresse salino *in vitro* mediante o acréscimo de NaCl ao meio de cultura sob uma ação gradativa e súbita para avaliar o comportamento fisiológico e bioquímico dessas plantas. As variedades de cana-de-açúcar foram submetidas a duas concentrações de NaCl (56mM, 112mM e o controle) de forma gradativa e repentina. Aos 35 dias de experimento, atividades enzimáticas da Catalase (CAT), Peroxidase (POX), Ascorbato peroxidase (APX), Polifenoloxidase (PPO), teores de sódio (Na^+), potássio (K^+), concentração de proteínas solúveis e prolina livre foram determinadas. Foi possível observar diferenças nas respostas das variedades em função da condição de indução do estresse salino, gradativo ou por choque, mais do que em função das concentrações de NaCl no meio de cultura. A

resposta ao estresse é, portanto, condicionada não só pela concentração dos sais, mas pela forma que a planta é exposta ao meio salino.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, sistema antioxidativo, estresse gradativo, choque osmótico, cloreto de sódio

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum*) is a grass considered moderately sensitive to salinity. Although traditionally cultivated in the soil of the Atlantic Coast and the Northeast, the cultivation of sugarcane is expanding to semi-arid regions. The poor quality of irrigation water, high rates of evaporation and low rainfall, combined with other factors contribute to the process of soil salinization in semi-arid. For the development and selection of tolerant genotypes, it is necessary to understand the physiological mechanisms with which plants face the salt stress. Techniques for *in vitro* plant tissue for studies of physiology and biochemistry of plants under stress are important tools to allow control and uniformity of culture conditions. In this study, two genotypes of sugarcane (RB931011 and RB872552) developed within the Program of Genetic Improvement of Sugarcane of rides, for the Northeast region (RIDESA) were evaluated for sudden and gradual action of salt stress-induced by adding NaCl to the culture medium during *in vitro* development of plants. The varieties of sugarcane were subjected to three concentrations of NaCl (0 mM, 50 mM and 100 mM) in a gradual and sudden. At 35 days of experiment, enzyme activities (CAT, POX, APX, PPO), levels of sodium (Na^+), potassium (K^+), soluble protein content and free

proline were recorded. It was possible to observe differences in responses of varieties depending on the condition of induced salt stress, shock or gradual, rather than depending on the concentration of NaCl in the culture medium. The stress response is therefore not only conditioned by salt concentration, but by way of exposure to salt.

Key-words: Sugarcane, antioxidative system, gradual stress, osmotic shock, sodium chloride

INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma poaceae perene, considerada moderadamente sensível à salinidade, e a diminuição do rendimento pode chegar a 50% em solos de condutividade elétrica de 10,4 dS m⁻¹ (SANTANA et al., 2006). Estudos em relação à tolerância da cana-de-açúcar à salinidade estão se tornando cada vez mais freqüentes na última década, tendo em vista o interesse nessa cultura para a produção de bioenergia e outros subprodutos, além da tradicional extração de sacarose. Áreas irrigadas são mais propensas à salinização dos solos, tendo em vista que as práticas de irrigação são mais freqüentes em regiões áridas e semi-áridas. Países tropicais e subtropicais têm incrementado as pesquisas com relação à tolerância dessa cultura a situações de estresse salino (GANDONOU et al., 2004). Os mecanismos de tolerância à salinidade ainda não estão bem elucidados, devido a este fenômeno ser extremamente complexo, podendo envolver alterações no desenvolvimento e na morfologia, bem afetar processos fisiológicos e bioquímicos. A tolerância à salinidade geralmente tem sido estudada com base nos mecanismos de regulação das homeostases iônica e osmótica, os quais são considerados ubíquos para o ajustamento osmótico celular. Contudo, além dos aspectos iônicos e osmóticos, o estresse salino também pode induzir estresse oxidativo pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AZEVEDO NETO, 2005) gerando um desequilíbrio entre a produção e o seqüestro dessas ROS, entre as quais destacam-se o íon superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila (OH[•]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para combater o excesso de ROS, as plantas possuem um complexo sistema de defesa, a fim de minimizar os danos causados pelo acúmulo dessas espécies reativas. Esse sistema de defesa envolve metabólitos como ascorbato, além de enzimas antioxidantes, como a catalase,

peroxidases e polifenoloxidase. Existe uma grande necessidade de identificar culturas e cultivares tolerantes à salinidade, pois as práticas de recuperação de solos com problemas acentuados de sais, em sua maioria, são onerosas e demoradas (MACÊDO et al, 2005). O desenvolvimento e a seleção de genótipos envolvem estudos sobre os mecanismos de tolerância da cultura. Os programas de melhoramento visando à tolerância à salinidade não terão êxito sem que se conheçam os mecanismos fisiológicos com os quais as plantas enfrentam o estresse salino. As técnicas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais para estudos de fisiologia e bioquímica de plantas em condições de estresse são importante ferramenta por permitirem o controle e homogeneidade das condições de cultivo (LERNER, 1985; LUTTS et al., 2004), além da possibilidade de abrigar um grande número de material vegetal em espaço físico reduzido, sem dependência de condições climáticas. Diante do exposto, objetivou-se contribuir para um melhor entendimento das respostas metabólicas da cana-de-açúcar sob o aumento gradual e súbito da salinidade.

Capítulo I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CANA-DE-AÇÚCAR

Desde sua introdução no Brasil, a cultura canavieira possui papel importante na economia nacional. Por várias décadas, a cana-de-açúcar foi a principal fonte de renda do país, principalmente para o Nordeste, onde se estabeleceu de forma definitiva. Hoje é produzida em mais de 70 países, sendo o Brasil seu maior produtor, seguido pela Índia e pela China (CONAB, 2007).

A produção brasileira de cana-de-açúcar foi de 569.062.629 toneladas na safra 2008/2009 refletindo um aumento em comparação a 2007 (UNICA, 2009). A expansão da área colhida em mais de 1,0 milhão de hectares (16,5%), é reflexo dos novos projetos que estão sendo implantados no país, com o objetivo de abastecer o mercado nacional e internacional com etanol (IBGE 2008).

O Estado de Pernambuco é o segundo em safra - 19.822.187 (t), produção de açúcar - 1.683.448 (t) e etanol - 511.576 (m³) do Norte/Nordeste (SINDAÇÚCAR, 2009). Embora tradicionalmente cultivada nas zonas úmidas de Mata e Litoral da região Nordeste, o cultivo da cana de açúcar vem se expandindo para regiões semi-áridas. Vários estados nordestinos estão desenvolvendo programas com a cultura no semi-árido com resultados animadores, como no caso de Juazeiro, na Bahia (SEAGRI, 2007). Em oito municípios do sertão pernambucano foram estabelecidos, em 2003, cultivos com uma variedade de cana-de-açúcar (cana do sertão) desenvolvida pela Universidade Federal Rural de Pernambuco em conjunto com outras universidades. Apesar de consumir pouca água, a cana do sertão ainda precisa de irrigação (FERNANDES, 2003).

O uso da irrigação na cultura da cana-de-açúcar tem contribuído, significativamente,

para o aumento da produtividade agrícola, além de permitir melhorias em áreas cujo potencial para exploração da agricultura é limitado, em razão de seus regimes pluviais. Por outro lado, a irrigação tem causado alguns problemas ao meio ambiente. Dentre eles, destaca-se o uso inadequado da água salina e/ou sódica resultando na perda da capacidade produtiva do solo (RHOADES et al., 1992).

2. ESTRESSE AMBIENTAL

As plantas estão envolvidas em condições que não são ideais para o seu desenvolvimento normal e podem estar no seu limite de sobrevivência. Estresses abióticos são conseqüências da exposição a condições climáticas extremas, como seca, salinidade, frio, altas temperaturas, solos alagados, poluição, etc. Em resposta, as plantas podem adaptar-se para evitar e superar o estresse por diversos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e genéticos. Os mecanismos de resistência ao estresse são classificados em dois tipos: evitar e/ou tolerar o estresse. Para evitar o estresse é necessário o estabelecimento das condições internas das células das plantas que não estão sob estresse apesar das condições externas, por exemplo: controle das altas temperaturas foliares para transpiração e prevenção contra a seca pela conservação da água (SHEPHERD E GRIFFITHS, 2006).

A tolerância envolve a resistência contra o estresse, onde as plantas podem ter suas funções realizadas sobre condições extremas, tanto estresse externo quanto interno. Como por exemplo: resistência a dessecação durante a seca, revitalizando a hidratação das células (SHEPHERD E GRIFFITHS, 2006).

O desenvolvimento de mecanismos fisiológicos especializados tais como: absorção seletiva de minerais, carregamento preferencial, remoção de sal através do xilema e excreção de sais, é mais uma característica de tolerância, enquanto que para evitar tais estresses muitas vezes, a planta faz uso de determinados processos biológicos atuando como dispositivos mecânicos e morfológicos que agem sob a forma de escudo contra os efeitos das condições extremas (SHEPHERD E GRIFFITHS, 2006).

3. SALINIDADE DOS SOLOS

A salinidade diz respeito à existência de níveis de sais no solo que interferem negativamente no rendimento das culturas, podendo causar prejuízo econômico (BATISTA ET AL., 2001). A salinidade do solo e da água é um atributo bastante variável no espaço e no tempo. Os fatores mais diretamente responsáveis por esta salinidade são: a natureza química dos solos, as interações com outros fatores, aumentando na perda de permeabilidade, elevação do nível do lençol freático e as variáveis climáticas, como pluviosidade, além das perdas hídricas por evaporação e evapotranspiração (GURGEL et al., 2003). Essas taxas de evaporação e as condições de precipitação pluviométrica, associadas às características do material de origem e às condições de relevo, condicionam a formação de solos com teores elevados de sais solúveis e sódio trocável (EILERS et al., 1995).

Solos afetados por sais são mais comuns em regiões áridas e semi-áridas, onde a precipitação anual é insuficiente para proporcionar a evapotranspiração necessária às plantas. Como resultado, os sais não lixiviam no solo. Ao contrário, eles acumulam em

quantidades nocivas para o crescimento vegetal. Contudo, os problemas com a salinidade não estão restritos somente a áreas semi-áridas, podendo aparecer em regiões sub-úmidas e úmidas sob determinadas condições (BOHN et al., 1979). Cerca de 5% do solo em que a cana-de-açúcar é cultivada (20 milhões de hectares) é salino, o que afeta a produtividade e a qualidade da colheita (PATADE et al., 2009), por isso existe uma necessidade constante do estudo para conhecimento de genótipos tolerantes, permitindo um melhor desempenho da cultura, frente ao sal.

4. EFEITO DA SALINIDADE SOBRE O DESENVOLVIMENTO, CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO DAS PLANTAS

As plantas podem ser classificadas como halófitas, aquelas que se desenvolvem naturalmente em ambientes com elevadas concentrações salinas (tipicamente Na^+ e Cl^-) e glicófitas, as que não são capazes de se desenvolver em ambientes com elevadas concentrações salinas. Plantas glicófitas, em um ambiente com grande quantidade de sais solúveis, têm uma limitação no seu crescimento e desenvolvimento (LEVITT, 1980), devido a alterações morfológicas, estruturais e metabólicas (ANDRADE NETO et al., 2003). A cana-de-açúcar é uma planta glicófita, e tem sua qualidade afetada quando exposta a salinidade (MUNIR e AFTAB, 2009).

O estresse salino causa efeitos nas plantas em diferentes proporções, dependendo de sua tolerância ao sal, e tais efeitos podem ser classificados como primários, que incluem efeitos osmóticos, desbalanço nas relações hídricas, resultando em uma redução e até inibição do crescimento do vegetal e secundários, que estão associados aos efeitos tóxicos específicos

dos íons; como 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 nucléicos; reações enzimáticas e conversões de fitormônios (LEVITT, 1980; WILLADINO & CAMARA, 2005) e deficiência de nutrientes induzida pela competição dos íons Na^+ e Cl^- com os demais íons durante o processo de absorção (LEVITT, 1980).

A inibição do crescimento das plantas na presença de sais ocorre por duas razões. Primeiramente devido ao efeito osmótico ou déficit hídrico provocado pelo excesso de sais, o qual reduz a habilidade de absorção de água, e também, devido ao efeito específico dos íons causado pelo excesso de íons, que entram no fluxo de transpiração e eventualmente causam injúria as folhas, reduzindo assim o crescimento (MUNNS, 2005). O efeito osmótico é causado por sais que estão no exterior da planta, diminuindo o potencial osmótico do solo, ocasionando em um déficit hídrico no vegetal. O efeito específico dos íons é causado pelo acúmulo de sais no interior da planta, impossibilitando a compartimentalização total dos sais nos vacúolos (MUNNS, 1993; WILLADINO e CAMARA, 2005).

O acúmulo de íons Na^+ na célula pode gerar distúrbios metabólicos que são em parte causados pela competição com íons K^+ , pois compete com sítios ativos enzimáticos no citoplasma (BLUMWALD et al., 2000) e nos ribossomos (TESTER e DAVENPORT, 2003). A estimativa da toxidez do íon Na^+ pode ser realizada através do cálculo da relação Na^+/K^+ , já que esse cátion inibe a atividade das enzimas dependentes do K^+ (JESCHKE, 1984). Se as plantas conseguirem manter essa relação relativamente baixa no citoplasma, e transportar os íons Cl^- e Na^+ para longe das folhas (sítio do metabolismo primário),

ocorrerá o crescimento da planta sob essa condição de estresse (TESTER e DAVENPORT, 2003).

De acordo com Lovato (1991), a salinidade afeta muitos processos fisiológicos nas plantas. Entretanto na maioria das espécies, a não ser no caso de extrema salinização, o sintoma mais aparente é uma diminuição no crescimento. À medida que a concentração de sal no ambiente aumenta acima de um determinado nível, a taxa de crescimento do vegetal diminui progressivamente. As espécies lenhosas e algumas plantas herbáceas, entretanto, apresentam sintomas de injúria foliar caracterizada por queimaduras das folhas, necrose e perda de folhas devido à toxidez de íons específicos (BEZERRA et al., 2001; TYERMAN e SKREETT, 1999; CUSHMAN et al., 1990).

De acordo com Shannon e Grieve (1999), o excesso de salinidade no ambiente pode provocar em algumas plantas, desbalanços nutricionais que causam a diminuição no crescimento e injúrias. O efeito da salinidade na planta depende de vários fatores, tais como umidade, temperatura, fertilidade do solo e o estágio de desenvolvimento da planta. De modo geral, Miranda (2000) afirmou que os maiores danos causados pelo estresse salino ocorrem durante a germinação, nos estágios iniciais de crescimento e na fase de frutificação de diversas espécies.

Entretanto, o efeito mais comum da salinidade é sobre o crescimento devido à redução da área foliar, com conseqüente redução da fotossíntese. A redução do crescimento, acompanhada pelo desenvolvimento de sintomas de toxidez de sódio e o cloro conforme a tolerância da espécie, pode ser devida à redução do potencial osmótico gerado pelo NaCl no meio externo ou acúmulo de sais nos tecidos das plantas (SHANNON e GRIEVE, 1999). Em cana-de-açúcar o NaCl afeta, negativamente, tanto o crescimento como o teor de

potássio (K^+), reduzindo a qualidade de campo, tanto em genótipos tolerantes quanto nos sensíveis, sendo observado maior redução nos sensíveis (ASHRAF et al., 2010)

O efeito da salinidade nas plantas aparece primeiramente no desvio de energia do processo de crescimento para manter o potencial osmótico. Um dos primeiros processos dos quais a energia é desviada é a elongação celular, portanto as células dos tecidos foliares se dividem, mas não se alongam. Adicionalmente, o efeito osmótico vai depender da sensibilidade da planta a determinado íon específico na água de irrigação ou na solução (BOHN et al., 1979).

De acordo com Tyerman e Skerrett (1999), em ambientes salinos, o cloreto de sódio (NaCl) tem se mostrado como sendo o sal predominante, causando a maioria das injúrias nas plantas. Por exemplo, na presença de elevada concentração externa de sódio, a absorção de potássio e cálcio pode ser inibida, causando deficiência desses nutrientes e aumento no teor de sódio nas células das plantas (FERNANDES, 2000).

Complexas interações entre os cátions podem ser a razão destes efeitos. A parte aérea é geralmente mais sensível aos distúrbios catiônicos que as raízes, e as diferenças são grandes entre as espécies de plantas na habilidade para prevenir ou tolerar elevadas concentrações de Na^+ nas folhas (FERNANDES, 2000).

Mecanismo de injúrias causado por sais em plantas envolve o desbalanço nutricional. Um exemplo é a toxicidade por bicarbonato em muitos ambientes salinos. Isto resulta primeiramente, na redução da disponibilidade de ferro em alto pH, comuns em solos com alta concentração de bicarbonato. A necessidade nutricional da planta pode variar com o tipo de sal presente. Por exemplo, altos níveis de sódio levam a deficiência de cálcio e magnésio; sais ricos em magnésio podem acarretar deficiência de cálcio. Altos níveis de pH

podem acentuar a deficiência de micronutrientes (BOHN et al., 1979).

O desequilíbrio nutricional causado pelo efeito da salinidade resultará na interferência na disponibilidade de nutrientes, competição nos processos de absorção, transporte, disponibilidade de nutrientes, competição nos processos de absorção ou distribuição na planta, ou pode ser causado por inativação fisiológica de um determinado nutriente, resultando em um aumento da necessidade interna por elementos essenciais (FERNANDES, 2000).

Os íons orgânicos mais importantes para o ajuste osmóticos são o potássio (K^+), sódio (Na^+) e o cloreto (Cl^-), mas ambe alguns soltos orgânicos são importantes, entre eles os que mais se associam com a tolerância a salinidade são o açúcar solúvel e a prolina (ABDEL, 2007). Elevadas concentrações de sódio e/ou cloro na solução do solo podem reduzir a atividade iônica e provocar extremas relações destes elementos com os macronutrientes. Como resultado, a planta torna-se susceptível a um dano osmótico, como também a desordens nutricionais que podem levar a uma perda de rendimento e de qualidade (FERNANDES, 2000).

7. ESTRESSE OXIDATIVO COMO RESPOSTA À SALINIDADE

Uma das alterações bioquímicas que ocorrem quando as plantas estão sujeitas ao estresse salino é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive Oxygen Species) (MELONI et al., 2003) ocasionando um estresse oxidativo. Tal fenômeno é acarretado por um desequilíbrio entre a produção e o seqüestro ROS, tais como o íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Porém, durante o metabolismo vegetal normal, as ROS são geradas como produto da cadeia transportadora de elétrons (MOLLER, 2001), sendo as mitocôndrias e cloroplastos importantes geradores intracelulares de ROS (MELONI et al., 2003). Em cloroplastos, as ROS podem ser geradas pela transferência direta da energia de excitação da clorofila *a* para produzir um oxigênio singlete, ou pela redução univalente do oxigênio do fotossistema I, na reação de Mehler (ASADA, 1999).

Níveis intermediários de ROS dão início a uma cascata de morte celular programada, permitindo que células comprometidas sejam eliminadas (DATT et al., 2003). A indução e execução da morte celular desencadeiam processos controlados e podem ser modulados por moléculas sinalizadoras, como o ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno (LAM et al., 1999).

O excesso de ROS pode causar danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, devido ao fato de serem altamente reativas e poderem alterar o metabolismo celular normal (AGARWAL e PANDEY, 2004; AZEVEDO NETO et al., 2005).

As ROS têm sido tradicionalmente, consideradas produtos tóxicos do metabolismo aeróbico (RENTEL e KNIGHT, 2004). Entretanto, nos últimos anos, tornou-se aparente que células vegetais produzem níveis endógenos basais de ROS (WOHLGEMUT et al., 2002). Assim, as ROS estariam atuando como moléculas sinalizadoras, onde um aumento no acúmulo de H_2O_2 e alterações no estado redox indicariam para uma possível mudança do ambiente (FOYER e NOCTOR, 2003).

Para combater o excesso de ROS, as plantas possuem um complexo sistema de defesa, a fim de minimizar os danos causados pelo acúmulo dessas espécies reativas. Esse sistema de defesa envolve metabólitos (ascorbato, glutathiona, tocoferol, etc) e enzimas antioxidantes

como a catalase (CAT), peroxidases não específicas (POX), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GSR), dentre outras (BRAY, 2000; FILIPI, 2004; AZEVEDO NETO, 2005). O termo antioxidante pode ser considerado para descrever inúmeros compostos capazes de dissipar essas espécies reativas, sem que a planta passe por uma destruição severa (DRÖGE, 2002).

Uma das respostas mais comuns a todos os organismos, submetidos ao estresse, é a produção e/ou acumulação de solutos compatíveis, entre esses solutos destaca-se a prolina.

O acúmulo desse aminoácido representa um mecanismo compensatório para melhor sobrevivência das plantas, atuando como um regulador osmótico, um protetor contra a desnaturação enzimática, reserva de carbono e nitrogênio, estabilizador da síntese de proteína e como um sequestrador de ROS.

A peroxidação de lipídeos insaturados presentes em membranas biológicas é o sintoma mais proeminente da ocorrência de estresses oxidativos em plantas. O malonaldeído (MDA), como produto da decomposição de ácidos graxos polinsaturados de biomembranas, apresenta um grande acúmulo em condições de estresse salino (GOSSET et al., 1994). A estabilidade da membrana celular tem sido amplamente usada para diferenciar cultivares tolerantes e sensíveis e, em alguns casos, uma alta estabilidade da membrana pode ser correlacionada à tolerância a estresses abióticos.

8. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA DAS PLANTAS AO ESTRESSE SALINO

Plantas tolerantes tem adotado certas estratégias na regulação de íons através das raízes (Wahid et al., 1999), caules (Wolf et al., 1992) ou folhas (Kumar et al., 1994).

Mudanças nos processos fisiológicos, através do acúmulo de íons, mostram uma adaptação causada por uma modificação morfológica da planta (Meinzer et al., 1994).

Devido ao fato de que o NaCl seja o sal mais solúvel e mais distribuído, não é de surpreender que todas as plantas têm mecanismos que estão envolvidos na regulação da acumulação e seleção de outros nutrientes comumente presentes em baixas concentrações como o K^+ e NO_3^- (MUNNS, 2002).

As plantas variam em sua tolerância a salinidade. E para entender os mecanismos fisiológicos responsáveis pela tolerância à salinidade é necessário saber se esse crescimento é limitado por efeitos osmóticos dos sais no solo ou se é da toxicidade dos íons no interior da planta. As plantas tolerantes à salinidade devem ser capazes de ajustar o potencial osmótico o que envolve tanto à absorção e o acúmulo de íons quanto à síntese de solutos orgânicos. É possível que o mecanismo mais importante para regular o potencial osmótico seja a absorção seletiva de íons. Plantas tolerantes possuem capacidade de adquirir nutrientes essenciais na solução salina em que a concentração de íons não essenciais (tóxicos) é muito maior que a de íons essenciais. Por exemplo, a concentração de Na^+ em solução de solos salinos é maior que a de K^+ . Entretanto, a relação Na^+/K^+ em plantas que crescem neste tipo de solo é aproximadamente um. Esta alta especificidade para a absorção de K^+ está presente em várias espécies de plantas (LIMA, 1997).

Em relação à cultura da cana-de-açúcar, considerada moderadamente sensível a salinidade (FRANCOISE e MAAS, 1999), existe diferenças entre os genótipos e os graus de tolerância (WAHID et al., 1997). Sob condições de salinas, o crescimento é afetado, diminuindo com o aumento do sal (FLOWERS, 2004). Uma forma para enfrentar o estresse é incrementar a tolerância ao sal na cultura, sendo possível através da biossíntese de

metabólitos secundários, (FRANCA et al., 2001), bem com ativando o sistema de defesa enzimático a fim de proteção contra o estresse salino. A capacidade de tolerância em cana-de-açúcar também está associada com a capacidade de exclusão de íons tóxicos das folhas, em especial as de crescimento ativo e também a compartimentalização na bainha foliar (GARCIA E MEDINA, 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta do sistema antioxidativo enzimático ao aumento gradativo ou repentino da concentração de cloreto de sódio (NaCl) em meio de cultura nos genótipos R872552 e RB931011 de cana-de-açúcar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a correlação entre o teor de Na^+ no tecido vegetal e a atividade de enzimas do sistema antioxidativo (peroxidases, catalase, polifenoloxidase) em dois genótipos de cana-de-açúcar (RB872552 e RB931011) submetidos a estresse salino gradativo ou por choque osmótico.
- Avaliar a influência do estresse salino sobre o acúmulo de prolina e a absorção potássica em dois genótipos (RB872552 e RB931011) de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL, M. Physiological aspects of mungbean plant (*Vigna radiata* L. Wilezek) in response to salt stress and gibberellic acid treatment. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v.3, p.200-213, 2007.

AGARWAL, S.; PANDEY, V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v.48, n.4, p.555 – 560, 2004.

ANDRADE NETO, R.C.; GÓES, G.B.; QUEIROGA, R.C.F.; NUNES, G.H.S.; MEDEIROS, J.F.; ARAÚJO, W.B.M. **Efeito de concentrações de salinidade e híbridos de melão sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial da plântula**. Mossoró: ESAM, 2003.

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

ASHRAF, M.; RAHMATULLAH; AFZAL, M.; AHMED, R.; MUJEEB, F.; SARWAR, A.; ALI, L. Alleviation of detrimental effects of NaCl by silicon nutrition in salt-sensitive and salt-tolerant genotypes of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Plant Soil**, v.326 p.381–391, 2010.

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.

BATISTA, M.J.; NOVAES, F.; SANTOS, D.G.; SUGUINO, H.H. **Drenagem como instrumento de dessalinização e prevenção da salinização de solos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente / Secretaria dos Recursos Hídricos, 2001. 203 p. (Série Informes Técnicos).

BEZERRA, J.S.; WILLADINO, L. ; CÂMARA, T.R. Crescimento de calos embriogênicos de milho submetidos ao estresse salino. **Scientia Agricola**, v.58, n.2, p.259-263, 2001.

BLUMWALD, E.; AHARON, G.S.; APSE, M.P. Sodium transport in plant cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.140-151, 2000.

BOHN, H.L.; McNEAL, B.L.; O'CONNOR, G.A. **Soil Chemistry**. New York. p.329.1979. CORDEIRO, G. **Salinidade em áreas irrigadas**. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA SEMI-ÁRIDO), 2002.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E.; Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville. American Society of Plant Physiologists, 2000. cap.22, p.1158-1203.

CUSHMAN, J.C.; DeROCHER, E.J.; BOHNERT, H.J. Gene expression during adaptation to salt stress. In: **Environmental Injury to Plants**. KATTERMAN, F (ed.). New York: Academic Press Inc., 1990. p.173 - 203.

DAT, J.F.; PELLINEN, R.; BEECKMAN, T.; VAN DE COTTE, B.; LANGEBARTELS, C.; KANGASJÄRVI, J.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. **Plant Journal** v.33, p.621–632, 2003.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **physiological reviews**, v.82, p.47–95, 2002.

EILERS, R.G.; EILERS, W.D.; PETTAPIECE, W.W.; LELYK, G. Salinization of soil. In: **The Health of Our Soils: Toward sustainable agriculture in Canada**. ACTON, D.F. & GREGORICH, L.J. (ed.). Quebec: Centre for Land and Biological Resources Research Research Branch Agriculture and Agri-Food, 1995. 1906 p.

FERNANDES, A.R. **Nutrição mineral e crescimento de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.), em solução nutritiva, em função do balanço de nutrientes e níveis de salinidade**. Lavras, 2000. 145 p.

FILIPI, S.B. **Papel da alantoína na nutrição nitrogenada e respostas antioxidativas de células de café em suspensão**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. (Tese de doutorado) 2004.

FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. *Journal of experimental botany* v.55, p. 307–19, 2004.

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

GARCIA, M; MEDINA, E. Acumulación de iones y solutos orgánicos en dos genotipos de caña de Azúcar, estresados con sales simples o suplementadas con calcio. **Bioagro**, v.21, n.1, p.3-14, 2009

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.

GURGEL, M.T.; MEDEIROS, J.F.; NOBRE, R.G.; CARDOSO NETO, F.C.; SILVA, F.V. Evolução da salinidade no solo sob cultivo de melão irrigado com águas de diferentes salinidade. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v.3, n.2, p.1- 13, 2003.

JESCHKE, W.D. K^+ - Na^+ exchanges at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. In: STAPLES, R.C.; TOENNIESSEN, G.H. **Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement**. New York: John Wiley and Sons, 1984. p.37-66.

KUMAR, S., K.M. NAIDU AND H.L. SEHTIYA, 1994. Causes of growth reduction in elongating and expanding leaf tissue of sugarcane under saline conditions. **Australian Journal of Plant Physiology**., 21: 79–83

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

LIMA, L.A. Efeito de sais no solo e na planta. In: GHEYI, H.R.; QUEIROZ, J.E. e MEDEIROS, J.M. (ed). **Manejo e controle da salinidade na agricultura**. Campina Grande: UFPB/SBEA, 1997.

LUTTS, S.; ALMANSOURI, M.; KINET, J.M. Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. **Plant Science**, v.167, p.9–18, 2004.

LOVATO, M.B. **Variabilidade genética da tolerância salina em populações de *Stylosanthes humilis* H. B. K. de diferentes regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1991. 134 p. (Tese de doutorado).

MEINZER, F.L., Z. PLAUT AND M.Z. SALIENDRA, 1994. Carbon isotope discrimination, gas exchange and growth of sugarcane cultivars under salinity. **Plant Physiology**., 104: 521–36

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.

MIRANDA, J.R.P. **Silício e cloreto de sódio na nutrição mineral e produção de matéria seca de plantas de Cajueiro Anão-Precoce (*Anacardium occidentale* L.) e de Moringa (*Moringa oleifera* Lam.)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. 186 p. (Tese de doutorado).

MØLLER, 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**, v.52, p.561–591, 2001.

MUNIR, N.; AFTAB F. The role of polyethylene glycol (PEG) pretreatment in improving sugarcane's salt (NaCl) tolerance. **Turkish Journal of Botany**, n.33, p.407-415, 2009.

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

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell Environment**, v.25, p.239-250, 2002.

PATADE, V.Y. Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in Sugarcane. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.134, p.24-28, 2009.

RENTEL, M.C.; KNIGHT, M.R. Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.135, p.1471-1479, 2004.

SHANNON, M.; GRIEVE, C.M.; FRANCOIS, L.E. Whole-plant response to salinity. In: **Plant-environment interactions**. WILKINSON, R.E. (ed.). New York: Marcel Dreker, 1990. p.199-244.

SHANNON, M.C.; GRIEVE, C.M. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Scientia Horticulturae**, v.78, p.5-38, 1999.

SHEPHERD, T.; GRIFFITHS, W. The effects of stress on plant cuticular Waxes. **New Phytologist**. Quality Health and Nutrition, Scottish Crop Research Institute, 2006.

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

TYERMAN, S.D.; SKERRETT, I.M. Root ion channels and salinity. **Scientia Horticulturae**, v.78, p.175-235, 1999.

WAHID, A., E. RASUL AND A. UR. RAO, 1997. Germination responses of sensitive and tolerant sugarcane lines to sodium chloride. **Seed Science and Technology**, 25: 465-70

WAHID, A., I. MASOOD, I. JAVED AND E. RASUL, 1999. Phenotypic flexibility as marker of sodium chloride tolerance in sunflower genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, 42: 85-94

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**, 1., 2005, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande, Universidade Federal da Paraíba, 2005. p.508-535.

WOHLGEMUT, H.; MITTLESTRASS, K.; KSCHIESCHAN, S.; BENDER, J.; WEIGEL, H.J.; OVERMYER, K.; KANGASJÄRVI, J.; SANDERMANN, H.J.; LANGEBARTELS, C. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. **Plant Cell and Environment**, v. 25, p.717–726, 2002.

WOLF, O., M.L. TONNET AND W.D. JESCHKE, 1992. Role of stem in the partitioning of Na⁺ and K⁺ in salt stressed barley. **Journal of Experimental Bototany**., 42: 697–704

YAHYA, A. Salinity effects on growth and on uptake and distribution of sodium and some essential mineral nutrients in sesame. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.7, p.1439-1451, 1998.

Capítulo II

Resposta antioxidativa quanto ao estresse gradativo e súbito
provocado pelo NaCl durante o cultivo *in vitro* nas variedades
RB872552 e RB931011 de cana-de-açúcar¹

1 – Trabalho desenvolvido no programa de mestrado em agronomia: Melhoramento Genético de plantas da (PPGMGP/UFRPE) a ser enviado para a revista Scientia Agricola

ANTIOXIDATIVE RESPONSE ON THE GRADUAL AND SUDDEN *IN VITRO* STRESS CAUSED BY NaCl IN VARIETIES RB872552-RB931011 OF SUGARCANE

Manuela Maria Cavalcante Granja^{*}; Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros; Terezinha R. Camara

UFRPE – R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – 52171-900 – Recife, PE – Brasil. ^{*} Autor correspondente <manukagranja@yahoo.com.br>

ABSTRACT: Physiological responses of sugarcane under different salt levels and forms of application of stress *in vitro* were evaluated in view of the effect of salinity on antioxidant system and in sodium and potassium. Two genotypes of sugarcane (RB931011 and RB872552), were subjected to two concentrations of NaCl (56 mM and 112 mM) in a gradual and sudden. Were observed at 30 days of experiment, enzyme activities (CAT, POX, APX, PPO), levels of sodium (Na⁺), potassium (K⁺), soluble protein content and free proline. The analysis was performed by the program Assistat 7.5 beta. In this study we observed differences in responses of varieties depending on the condition of induced salt stress, shock or gradual, rather than depending on the concentration of NaCl in the culture medium. The stress response is therefore not only conditioned by salt concentration, but by way of exposure to salt.

Key words: ascorbate peroxidase; catalase, polyphenoloxidase; proline; specific ions; *Saccharum officinarum*

RESPOSTA ANTIOXIDATIVA QUANTO AO ESTRESSE GRADATIVO E SÚBITO PROVOCADO PELO NaCl DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* NAS VARIEDADES RB872552 E RB931011 DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO: Respostas fisiológicas em cana-de-açúcar submetidas a diferentes níveis de sal e formas de aplicação do estresse *in vitro* foram avaliados, tendo em vista o efeito da salinidade no sistema antioxidante e nos teores de Na^+ e K^+ . Dois genótipos de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552), foram submetidas a duas concentrações de NaCl (56mM e 112mM) de forma gradativa e repentina. Foram observadas, aos 30 dias de experimento, atividades enzimáticas (CAT, POX, APX, PPO), teores de sódio (Na^+), potássio (K^+), concentração de proteínas solúveis e prolina livre. E os dados quantitativos foram analisados pelo programa estatístico ASSISTAT 7,5 *beta*. Analisando os resultados, foi possível observar diferenças nas respostas dos genótipos RB872552 e RB931011 em função da condição de indução do estresse salino, gradativo ou por choque, mais do que em função das concentrações de NaCl no meio de cultura. A resposta ao estresse é, portanto, condicionada não só pela concentração salina do meio de cultivo, mas pela forma que as células do explante são expostas ao sal.

Palavras-chave: ascorbato peroxidase, catalase, polifenoloxidase, prolina, *Saccharum officinarum*

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea considerada moderadamente sensível à salinidade, apresentando diminuição do rendimento de até 50% em solos com condutividade elétrica de 10,4 dS m⁻¹. Embora tradicionalmente cultivada nas zonas úmidas de Mata e Litoral da região Nordeste, o cultivo da cana-de-açúcar vem se expandindo para regiões semi-áridas. Devido à má qualidade da água de irrigação, altas taxas de evaporação e baixa precipitação pluviométrica, aliada ao material de origem contribuem para o processo de salinização dos solos do semi-árido. Estudos em relação à tolerância da cana-de-açúcar à salinidade estão se tornando cada vez mais frequentes na última década tendo em vista o interesse nessa cultura para a produção de bioenergia e outros subprodutos. O desenvolvimento e a seleção de genótipos envolvem estudos sobre os mecanismos de tolerância da cultura e para isso, é necessário o conhecimento dos mecanismos fisiológicos com os quais as plantas enfrentam o estresse salino. As técnicas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais para estudos de fisiologia e bioquímica de plantas em condições de estresse são importantes ferramentas por permitirem o controle e homogeneidade das condições de cultivo. Dois genótipos de cana-de-açúcar desenvolvidos dentro do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar da RIDESA, para a região Nordeste foram avaliados quanto à ação gradativa e repentina do estresse salino, induzido pelo acréscimo de NaCl ao meio de cultura durante o desenvolvimento *in vitro* das plantas. Aspectos bioquímicos dos dois genótipos de cana-de-açúcar foram avaliados com o intuito de averiguar seu efeito sobre a natureza oxidativa do estresse salino e a capacidade dos genótipos em manter a sua homeostase iônica e redox.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e cultivo dos genótipos in vitro

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da UFRPE. Foram utilizados dois genótipos de cana-de-açúcar: RB931011 e RB872552 desenvolvidos pela RIDESA desenvolvidos através do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar, para a região Nordeste. As plantas dos genótipos supracitados foram provenientes do cultivo *in vitro* em Sistema de Imersão Temporária, da Biofábrica Governador Miguel Arraes, do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Condições de cultivo e meio de cultura

As plantas provenientes do sistema de imersão temporária foram cultivadas em sistema de propagação convencional utilizando o meio nutritivo MS (Murashige & Skoog 1962) na forma líquida e acrescido de sacarose (3%). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, 104 kPa, durante 20 minutos, o qual foi distribuído em frascos com capacidade para 250 mL, onde cada frasco recebeu 20 mL de meio.

Um total de 1200 plantas foram utilizadas, sendo 600 plantas do genótipo RB 931011 e 600 do genótipo RB872552. As plantas, na fase final de enraizamento, oriundas da Biofábrica foram selecionadas e adaptadas em frascos com meio nutritivo MS líquido por um mês antes da aplicação dos tratamentos.

Após o período de adaptação, foram selecionadas cinco plantas e transferidas para outro frasco contendo cinco mL de meio MS com 8mM e 16mM de NaCl, nos tratamentos T1 e T2 respectivamente, na condição gradativa. Na condição de choque, os frascos continham 30 mL do meio MS com as concentrações de 56mM e 112mM, para os tratamentos T1 e T2, respectivamente. O experimento foi mantido por 35 dias em sala de crescimento a uma temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por luz branca fria.

A unidade experimental foi um frasco com cinco plantas e foram mantidas 20 repetições por tratamento. Dois tratamentos salinos foram estabelecidos (T1 = 56 mM de NaCl; T2 = 112 mM de NaCl) e um tratamento controle (T0) sem adição de NaCl. As plantas foram individualizadas nos potes contendo os tratamentos iniciais (T0 = controle; T1 = 8 mM de NaCl e T2 = 16 mM de NaCl). A partir disso, gradativamente a cada cinco dias, foram adicionados cinco ml de meio, aumentando a concentração salina (T1 em 8 vezes e T2 em 16 vezes), até alcançar as concentrações finais de cada tratamento (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM), conforme ilustrado na Tabela 1. Na condição de choque osmótico, os tratamentos foram as concentrações finais (T0 = controle; T1 = 56 mM e T2 = 112 mM de NaCl).

Tabela 1. Descrição da adição de NaCl na condição gradativa para o estabelecimento final dos tratamentos.

Concentração final NaCl	Adição gradativa de NaCl ao longo dos dias							
	0	5	10	15	20	25	30	35
	Acréscimos de NaCl em mM							
0	0	0	0	0	0	0	0	Coleta
56	8	16	24	32	40	48	56	Coleta
112	16	32	48	64	80	96	112	Coleta

A coleta de matéria fresca e seca para a realização das análises enzimáticas e bioquímicas foram realizadas ao final do experimento (35 dias). As plantas de cada tratamento foram utilizadas para avaliação da resposta antioxidativa através de ensaios enzimáticos, determinação dos teores de prolina e teores de Na^+ e K^+ para cálculo da relação Na^+/K^+ . Das 20 repetições de cada tratamento, 15 foram utilizadas para determinação dos teores de prolina e Na^+ e K^+ , as demais foram usadas para análises enzimáticas e bioquímicas: polifenoloxidase, ascorbato peroxidase, peroxidase, proteínas totais solúveis, catalase.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento, num fatorial $3 \times 2 \times 2$, onde foram analisados os níveis de salinidade, a condição do estresse (gradativo ou choque) e os dois genótipos.

Análises bioquímicas

Os extratos enzimáticos foram obtidos a partir da maceração de 0,2g de folhas previamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em congelador a -20°C até o momento da preparação dos extratos. Foi utilizado tampão fosfato (Fosfato monobásico 100 mM, 50 mg de PVP, pH 6,5). O macerado foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 10 min e o sobrenadante transferido para novos tubos e conservados a -20°C para posterior utilização (Azevedo et al., 1998). Todas as análises enzimáticas foram realizadas por meio de espectrofotometria.

O método de extração para as análises enzimáticas seguiu a metodologia de Azevedo et al. (1998). Todas as etapas foram realizadas a frio (em banho de gelo).

Determinação de proteínas solúveis totais

A quantificação das proteínas foi realizada pela metodologia descrita por Bradford (Bradford, 1976). Em tubos de ensaio de 15 mL depositou-se 100 µL de cada amostra juntamente com 2 mL do Reagente de Bradford, após agitação, ficou em repouso por 15 min. Após isso, procederam-se as leituras a 595nm. As absorbâncias obtidas foram comparadas com a curva padrão (solução estoque de albumina bovina - 1 mg/mL) e os dados expressos em mg de proteínas totais /g de matéria fresca.

*Determinação da atividade enzimática**Catalase (E.C. 1.11.1.6)*

Para análise desta enzima aqueceu previamente a solução tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) por 20 min a 30°C. A seguir, adicionou-se 1390µL do tampão, 50 µL do extrato e 60 µL de peróxido de hidrogênio (0,5 M) (Beers e Sizer, 1952). Após agitação realizaram-se duas leituras a 240 nm, sendo uma no momento inicial (Ti) e a outra após 1 minuto (Tf). Para cálculo desta enzima utilizou-se a diferenças entre as médias. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que causou o aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto nas condições utilizadas no experimento.

Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)

Para a quantificação desta enzima utilizou-se a metodologia descrita por Fatibello & Vieira, 2002. Ao tubo de ensaio adicionou-se 1350 μL de guaiacol (0,05 M), 100 μL da amostra e 50 μL de peróxido de hidrogênio (0,1 M). Após agitação registrou-se os valores da primeira leitura, sendo a segunda efetuada 1 minuto após.

A determinação da atividade foi feita medindo-se a variação de absorbância a 470 nm da substância formada na reação enzimática (tetraguaiacol). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que causou o aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto nas condições citadas anteriormente.

Ascorbato Peroxidase (E.C. 1.11.1.1)

Foi utilizada a metodologia descrita por Nakano e Asada (1981). O tampão utilizado foi o fosfato de potássio (0,05M, 0,001 M EDTA, pH 6,0). Para a leitura, em cubetas de quartzo, foi adicionado 1335 μL de tampão, 75 μL da amostra, 75 μL de ascorbato (0,01 M) e 15 μL de peróxido de hidrogênio (0,1 M). Após agitação registrou-se os valores da primeira leitura, sendo a segunda efetuada após 1 minuto. A determinação da atividade foi feita medindo-se a variação de absorbância a 290 nm do tempo inicial e após 1 minuto.

Polifenoloxidase (E.C. 1.14.18.1)

Para a determinação dessa enzima foi utilizada a metodologia de Kar & Mishra (1976). Em cubetas de quartzo adicionou-se 1 ml de pirogalol (50 μM) e 0,25 mL da amostra, após 5 minutos a reação foi interrompida com a adição de 0,25 mL de ácido

sulfúrico a 5%. Agitou-se a cubeta e rapidamente fez a leitura. O cálculo da atividade específica foi realizado dividindo-se a atividade total pelo conteúdo protéico.

Prolina livre

Para análise deste iminoácido adicionou-se 1,0 mL do extrato enzimático em tubos de ensaio de 15 mL rosqueáveis contendo 1,0 mL de ninhidrina ácida e 1,0 mL de ácido acético glacial concentrado (Bates, 1973). Os tubos foram acondicionados em banho-maria, a 100°C, por 1 h. A reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho-maria a 2°C. Em seguida, uma alíquota de 2,0 mL de tolueno foi adicionada ao tubo que em seguida foi agitado. A fase aquosa superior (cromóforo + tolueno) foi recuperada e submetida à leitura a 520 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de prolina (0,0115g de prolina em um volume final de 100 mL com água deionizada) e os resultados expressos em mg de prolina /g de matéria fresca.

Determinação dos teores de Na^+ e K^+

Os teores de sódio e potássio da parte aérea foram analisados após digestão nitroperclórica do material seco, por espectrofotometria de chama (Malavolta, 1989). As amostras de plantas foram secas em estufa com aeração, a $65 \pm 5^\circ C$, por 24h. Em seguida as amostras foram trituradas e para as análises foram utilizadas 100mg de matéria seca moída.

Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa ASSISTAT Versão 7.5 beta (Silva, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO*Catalase (CAT)*

A atividade da catalase nas plantas tratadas com 112 mM superou a das plantas dos demais tratamentos (Figura 1A).

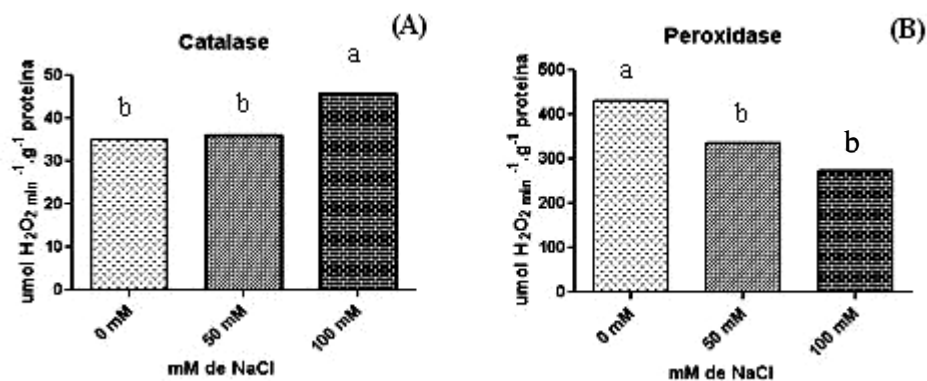


Figura 1. Atividade da CAT e POX em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob dois níveis de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM de NaCl). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O estresse salino, como outros estresses ambientais, ocasiona um desequilíbrio na produção e seqüestro de espécies reativas de oxigênio (ROS), provocando um aumento

desordenado dessas espécies oxidantes nos tecidos da planta que pode levar a danos severos para o vegetal (Mittler, 2002). O mecanismo enzimático de detoxificação das ROS pode ocorrer de forma sequencial ou simultânea mediante a atividade de diversas enzimas. 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 (McKersie & Leshem, 1994; 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 (Koolman & Roehm, 2005). Apesar de ser encontrada predominantemente nos peroxissomos onde atua na remoção do H_2O_2 formado durante a fotorrespiração (Morita et al., 1994), a CAT é indispensável na detoxificação das ROS durante o estresse, quando elas são geradas em excesso. Há evidências de que essa enzima protege a célula dos efeitos do H_2O_2 produzido fora dos peroxissomos e que poderia estar envolvida na remoção do peróxido de hidrogênio gerado em outros compartimentos celulares (Willekens et al., 1997). O estresse oxidativo provoca a proliferação de peroxissomos, e um adensamento dessa organela pode aumentar a eficiência no seqüestro das ROS, em especial do H_2O_2 que se difunde do citosol para os peroxissomos (Mittler, 2002).

Em relação às variedades e a forma de aplicação do estresse, registrou-se efeito significativo da interação (Figura 2A). A atividade da catalase na variedade RB872552 aumentou quando o estresse foi imposto de forma não gradativa, superando os valores da atividade enzimática da variedade RB 931011.

No que se refere à condição de indução do estresse salino, observou-se que as variedades estudadas responderam de forma distinta. Na variedade RB872552 a adição não fracionada de NaCl causou um aumento na atividade da CAT. Nessa condição a atividade

da enzima foi maior do que no estresse gradativo dessa variedade e também superior em relação a variedade RB931011. A severidade do estresse pode ser determinada tanto pela intensidade quanto por sua duração. O brusco aumento da concentração de NaCl pode ter provocado um súbito aumento do teor das ROS e sinalizado para a ativação da CAT para assegurar a detoxificação do H_2O_2 , na variedade RB872552. Essa resposta pode representar o que se conhece por ‘*burst*’ oxidativo, que se caracteriza por um súbito e passageiro aumento do teor das ROS, sem que se instale o estresse oxidativo (Gaspar et al., 2002). Diferentes genótipos podem responder de forma diferenciada ao estresse abiótico, podendo evitar o estresse oxidativo. O aumento da atividade da CAT supõe uma possível adaptação para superar os danos causados pelo acúmulo de H_2O_2 produzido durante o metabolismo, sendo mais observados em genótipos tolerantes ao sal em relação aos genótipos sensíveis (Sairam et al., 1997). Costa et al (2005) registraram resultados semelhantes com um aumento da CAT em folhas de genótipo de sorgo tolerante à salinidade, enquanto no genótipo sensível não houve variação. Resultados similares foram relatados na comparação de genótipos de arroz (Sudhakar et al., 2001) e trigo (Sairam et al., 2002). Por outro lado, folhas de feijoeiros submetidos à salinidade exibiram uma diminuição na atividade da CAT em relação a plantas mantidas sem sal (Cavalcanti et al., 2004).

Peroxidase (POX)

Houve efeito significativo dos tratamentos salinos, das formas de aplicação do estresse e das variedades sobre a atividade da peroxidase. Os tratamentos salinos causaram

uma diminuição da atividade da POX em relação ao controle, em ambas as variedades, mas não houve diferença entre os tratamentos com 56 e 112 mM de NaCl (Figura 1B).

No que se refere à forma de aplicação do estresse, observou-se que a atividade da POX na variedade RB931011 foi maior quando o estresse foi imposto gradativamente e superou a da variedade RB872552. Quando a adição de NaCl ao meio de cultura não foi gradual, a atividade da POX não diferiu entre as variedades. Não se observou efeito da forma de indução do estresse sobre a variedade RB872552. As peroxidases (POD) são óxido-redutases capazes de catalisar a transferência do hidrogênio de um doador de elétrons, diferente do ascorbato, para o H_2O_2 . Em plantas, a ação constitui uma proteção antioxidativa, embora em seu ciclo hidroxílico haja geração de ROS (Bor et al., 2003, Raven, 2003). A adição de NaCl ao meio de cultura coincidiu com uma diminuição na atividade da POD representada, principalmente, pela queda na atividade da enzima na variedade RB931011 quando o estresse foi imposto na condição de choque.

Ascorbato peroxidase (APX)

A análise da interação entre variedades e níveis de NaCl demonstrou que a atividade da ascorbato peroxidase (APX) da variedade RB931011 não variou em função da presença de NaCl. Por outro lado, na variedade RB872552 a atividade enzimática foi maior nas plantas submetidas a 112 mM de NaCl do que naquelas dos demais tratamentos, bem como superou a variedade RB931011 quando submetida ao nível mais alto de NaCl (Figura 3A).

O efeito da interação entre as variedades e a condição de indução do estresse salino foi significativo (Figura 2C). Na variedade RB931011 a atividade da peroxidase do ascorbato maior quando o aumento da concentração de NaCl foi gradativo. A variedade RB872552, entretanto, apresentou maior atividade enzimática quando submetida ao choque osmótico do que quando tratada com aumento gradativo da concentração salina do meio de cultura.

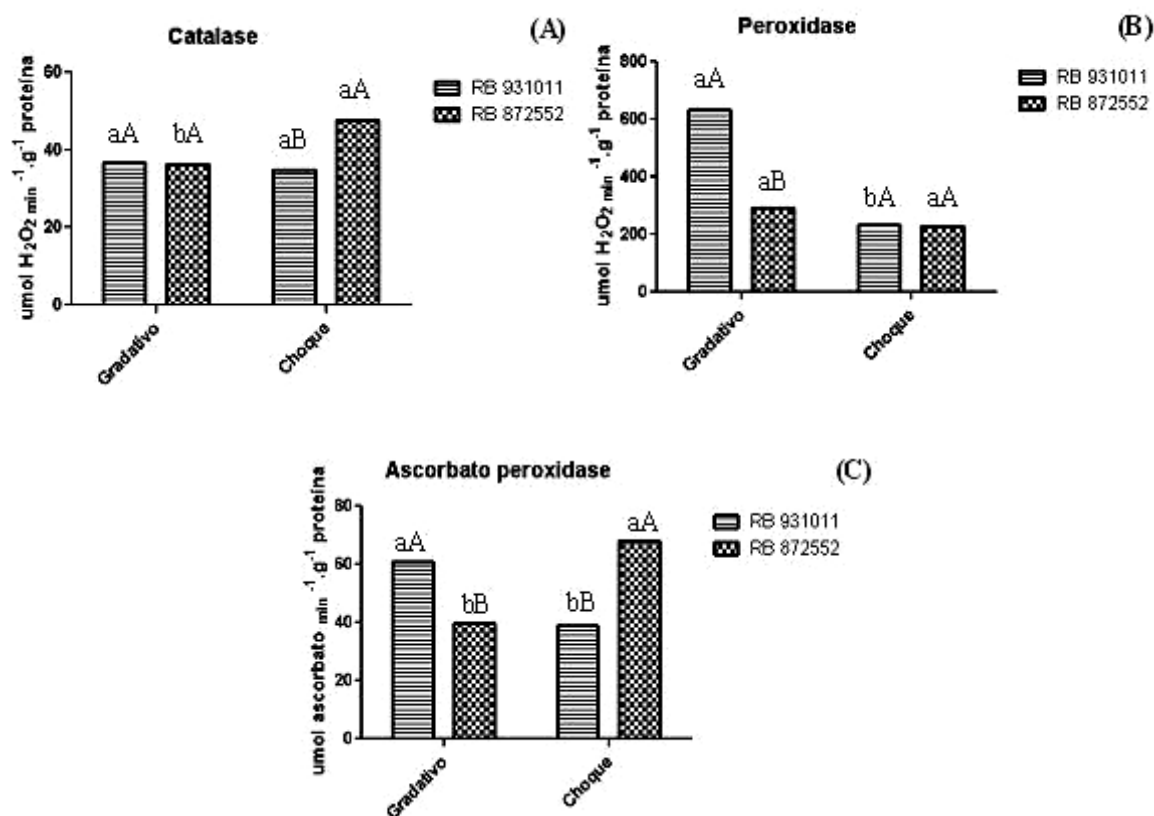


Figura 2. Atividade da CAT, POX E APX em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* em resposta à condição de aplicação (Gradativa ou Choque) do estresse salino. Letras idênticas, maiúsculas entre variedades e minúsculas entre condição de aplicação do estresse, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

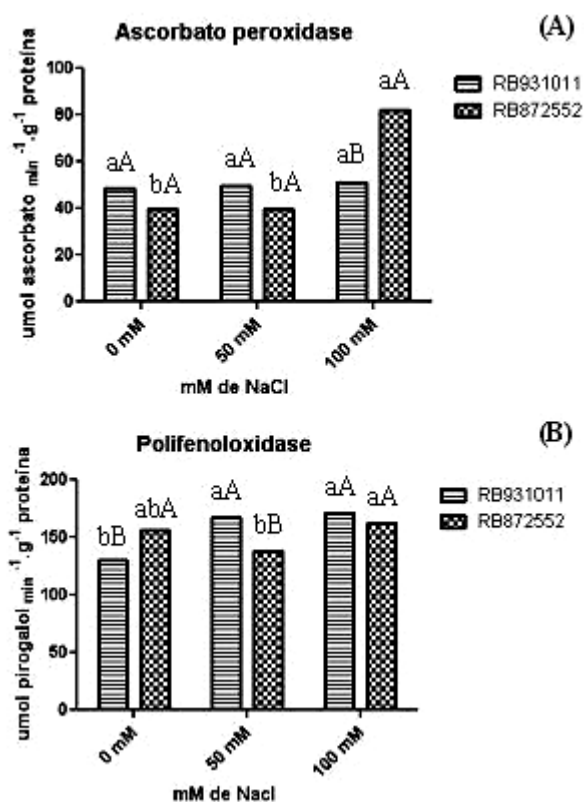


Figura 3. Atividade da APX e PPO em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob duas concentrações de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM). Letras idênticas, maiúsculas entre variedades e minúsculas entre os níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Outra enzima que participa ativamente da remoção do H_2O_2 é a peroxidase do ascorbato (APX). A atividade da CAT e da APX não é redundante porque elas não compensam totalmente uma à outra e, atualmente, tem-se concluído que o citosol, com a atuação da APX no ciclo do ascorbato-glutationa, e os peroxissomos com a CAT, podem servir de zona tampão para controlar a superprodução de ROS que atingem distintos compartimentos celulares durante as situações de estresse (Mittler, 2002).

A atividade da APX aumentou na variedade RB872552 quando as plantas foram submetidas à concentração de 112 mM de NaCl no meio de cultura e quando o estresse não foi gradativo. Por outro lado, na variedade RB931011 a atividade da APX foi menor do que na RB872552 e não variou em função da presença de NaCl no meio de cultura. A atividade da APX é uma rota chave de tolerância de citrus em resposta ao estresse salino, comparando a resposta dessa enzima em plantas tolerantes e sensíveis ao sal (Getha-Dahan et al., 1997). A ativação da APX também foi muito superior em cultivares de trigo tolerantes ao sal (Mandhania et al., 2006). Encontrada predominantemente no citosol, mitocôndrias e cloroplastos, a APX utiliza o ascorbato como doador de elétrons para neutralizar o H_2O_2 , atuando no ciclo do ascorbato-glutationa (Shigeoka et al., 2002). A ocorrência desse ciclo em cloroplastos, citosol, mitocôndrias, apoplasto e peroxissomos, associada à alta afinidade da APX pelo H_2O_2 conferem a essa enzima um papel crucial no controle do nível de ROS na célula vegetal (Mittler, 2002).

Polifenoloxidase (PPO)

Observou-se interação significativa entre os efeitos dos níveis de NaCl e a forma de adição desse sal ao meio de cultura (Figura 4). O aumento gradativo da concentração de NaCl no meio de cultura não provocou alteração na atividade da PPO, entretanto, no tratamento com 112 mM de NaCl quando o sal foi adicionado de uma só vez (condição indutora de choque osmótico), a atividade da PPO aumentou em relação aos outros dois níveis de salinidade e foi superior também à atividade da PPO das plantas que receberam com 112 mM de forma gradativa.

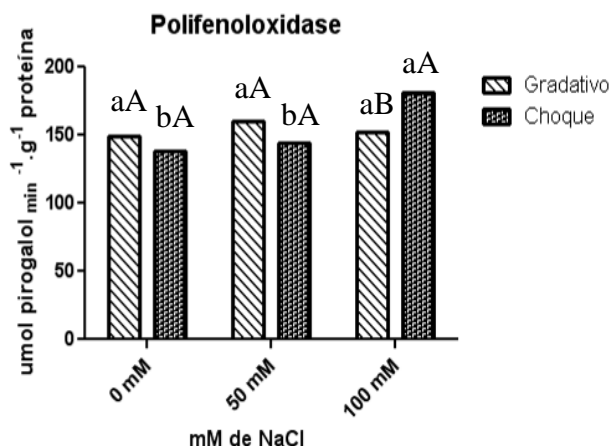


Figura 4. Atividade da PPO de duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* em resposta à concentração de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM) e à condição de aplicação (Gradativa ou Choque) do estresse salino. Letras idênticas, maiúsculas entre as condições de indução do estresse salino e minúsculas entre os níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As variedades responderam de forma distinta à ação do NaCl sobre a atividade da PPO. Na variedade RB931011 foi observado um incremento da atividade enzimática nas plantas dos tratamentos com NaCl, em relação àquelas tratadas sem acréscimo de sal. A variedade RB872552, entretanto, não apresentou diferença entre os tratamentos com NaCl e o tratamento controle. Por outro lado, nessa variedade as plantas submetidas à concentração de 56 mM exibiram menor atividade enzimática do que nos tratamentos com 112 mM de NaCl (Figura 3B). Houve aumento na atividade da PPO e não variou na imposição gradativa do estresse. Essa condição estressante parece ser bastante agressiva e difere da aplicação gradativa do estresse, disparando a resposta antioxidativa. A condição de indução do estresse permitiu distinguir uma maior eficiência defensiva, em especial na variedade RB931011.

O aumento na atividade da PPO em tratamentos com NaCl já tinha sido registrado por Agarwal & Pandey (2004) em folhas de *Cassia angustifolia* e em plântulas de feijão (Demir & Koçaliskan, 2001) sob condições salinas. A POD e a PPO são as duas principais enzimas responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos (Sheen & Calvert, 1969) e podem desempenhar um importante papel de defesa contra o estresse salino (Agarwal & Pandey, 2004). Os dados obtidos neste trabalho, no qual ambas as variedades (RB931011 e RB872552) apresentaram aumento da atividade da PPO, sugerem que a defesa enzimática contra o estresse, com a utilização de compostos fenólicos como redutores do H_2O_2 se dá pela ação da PPO e não da POD.

Proteínas solúveis totais

O teor de proteínas solúveis totais caiu nas plantas submetidas ao tratamento com 112 mM de NaCl (Figura 5A). Essa queda no teor protéico foi decorrente, principalmente, da indução brusca do estresse, uma vez que não se verificou alteração no teor de proteínas solúveis quando o estresse foi induzido gradativamente (Figura 6A).

Em relação às variedades, na RB931011 o teor de proteínas decresceu com a presença de NaCl no meio de cultura. Essa tendência também foi observada na variedade RB872552, mas não de forma significativa. Não se observou diferença entre o teor de proteínas solúveis das variedades quando estiveram sob tratamento salino (Figura 6B).

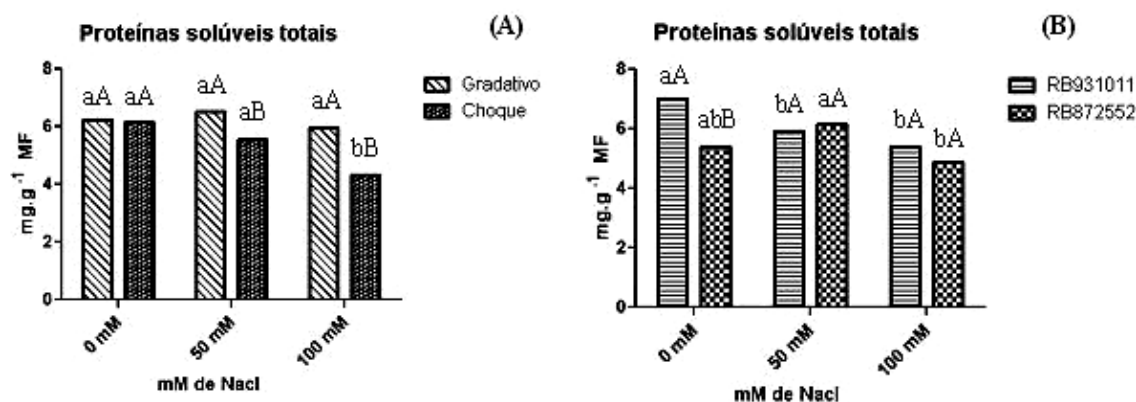


Figura 5. Teor de proteínas solúveis e prolina em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob dois níveis de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM de NaCl). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

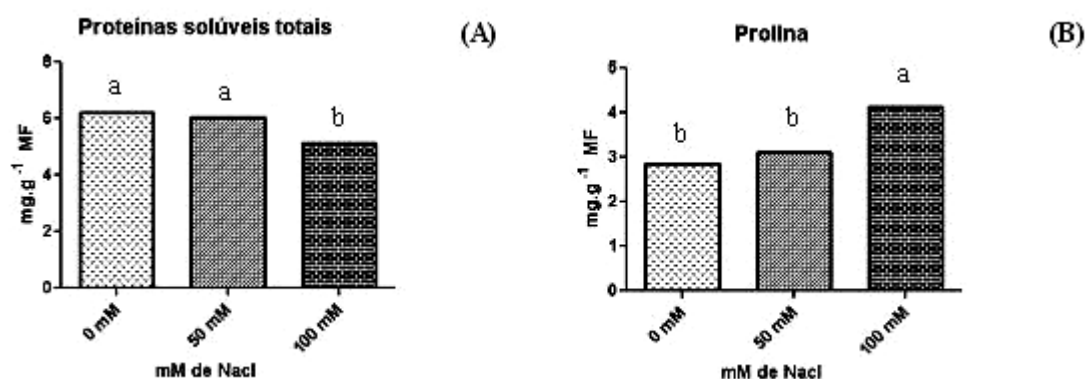


Figura 6. Teor de proteínas solúveis em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob duas concentrações de NaCl (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM) e condições do estresse salino. Letras idênticas, maiúsculas entre variedades ou condição do estresse e minúsculas entre os níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As proteínas são frequentemente degradadas e restabelecidas de forma a assegurar a reutilização de aminoácidos e adequar o conteúdo protéico para fazer frente às condições ambientais (Piza et al., 2003). Segundo Levitt (1980), o NaCl provoca diminuição da

síntese de proteína e aumenta a hidrólise protéica em grande grupo de plantas, sendo a hidrólise considerada o efeito primário do sal. 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 ou à inibição da incorporação destes aminoácidos nas proteínas.

Prolina

O teor de prolina aumentou apenas nas plantas submetidas ao tratamento com 112 mM de NaCl (Figura 5B), independente da variedade e da condição de indução do estresse.

No presente estudo o teor de prolina aumentou com os níveis de NaCl utilizados, conferindo maior proteção às variedades de cana-de-açúcar frente ao estresse salino. Porém não variou em relação à forma do estresse e nem entre variedades. Segundo Cavalcanti et al 2004 o teor de prolina, em folhas de feijão, aumentou progressivamente devido ao choque osmótico e também foi observado, em arroz, aumento de prolina na cultivar mais sensível ao sal. O efeito do aumento da concentração de prolina, no estresse salino, tem sido extensivamente estudado em outras plantas. Em alguns legumes (alfalfa, soja) tem-se observado que o estresse salino também resultou em uma acumulação desse aminoácido (Tramontano & Jouve, 1997). Os solutos compatíveis, como a prolina, atuam como osmoprotetores de macromoléculas e de membranas. Por seu caráter hidrofílico, a prolina pode substituir a água na superfície das proteínas e agir, não enzimaticamente, como chaperonas de baixo peso molecular (Timesheff & Arakawa, 1989; Hasegawa et al., 2000). O acúmulo de prolina, e outros osmólitos, ainda é um tema controverso. As rotas metabólicas que conduzem à síntese de osmólitos estão conectadas às rotas do metabolismo

básico. As enzimas requeridas para essas extensões das rotas metabólicas são induzidas pelo estresse. Greenway & Munns (1980) apontam a favor da visão do osmólito como um dreno de poder redutor resultante de um distúrbio metabólico. A rota que leva à síntese de um osmólito particular pode ser mais importante do que a acumulação *per se* (Bohnert & Shen, 1999; Nuccio et al., 1999). O acúmulo de prolina é um exemplo. Sob estresse, o desequilíbrio entre geração e utilização de NADPH pode alterar o estado redox celular. A síntese de prolina, seguindo a ativação transcricional da P5CS (P5C sintetase) dependente de NADPH, poderia atuar como uma válvula protetora por meio da qual a regeneração do NADP^+ proporcionaria o efeito protetor observado (Nelson et al., 1998).

Sódio (Na^+), Potássio (K^+) e relação Na^+/K^+

Figura 7 mostra o aumento (7,8 vezes) no teor de Na^+ e o decréscimo (1,7 vezes) no de K^+ , com consequente incremento na relação Na^+/K^+ ocasionados pela adição de NaCl no meio de cultivo *in vitro*.

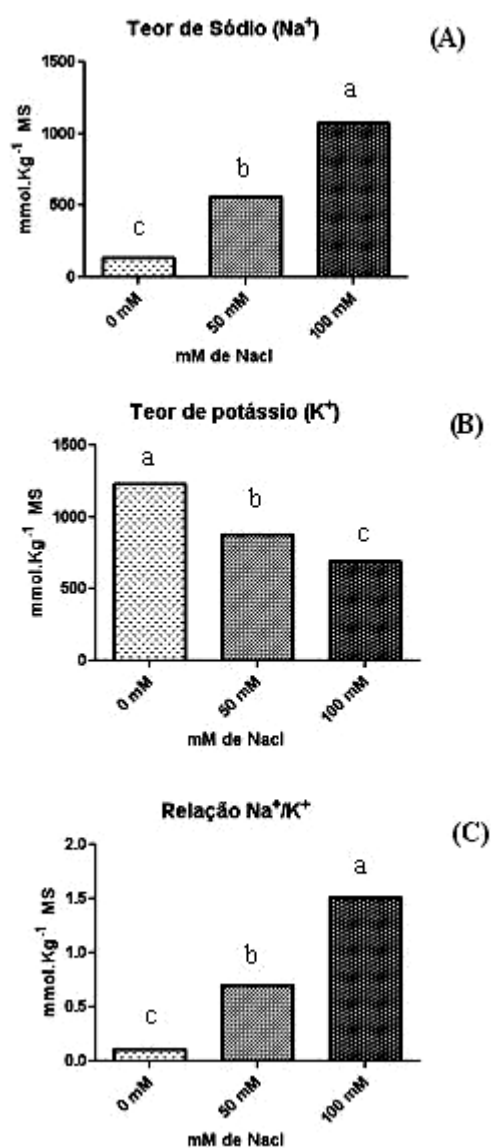


Figura 7. Concentração dos íons Na⁺ e K⁺ e relação Na⁺/K⁺ em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de NaCl. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

Houve correlação positiva entre a concentração de NaCl no meio de cultivo e o teor do íon sódio (Na⁺) registrando acúmulo na parte aérea das variedades analisadas.

Resultados similares em plântula de milho também foram registrados por Azevedo Neto & Tabosa (2000), e por Cavalcanti et al. (2004) em folhas de feijão. O acúmulo de íons Na^+ na célula pode gerar distúrbios metabólicos que são em parte causados pela competição com íons K^+ pelos sítios enzimáticos ativos no citoplasma (Blumwald et al., 2000) e nos ribossomos (Tester e Davenport, 2003).

Na indução não gradual do estresse salino o acúmulo de Na^+ e a relação Na^+/K^+ foram superiores ao das plantas submetidas ao estresse gradativo (Figura 8) em ambas as variedades. Por outro lado, a concentração de K^+ foi maior na variedade RB872552 do que na variedade RB931011 (Figura 9).

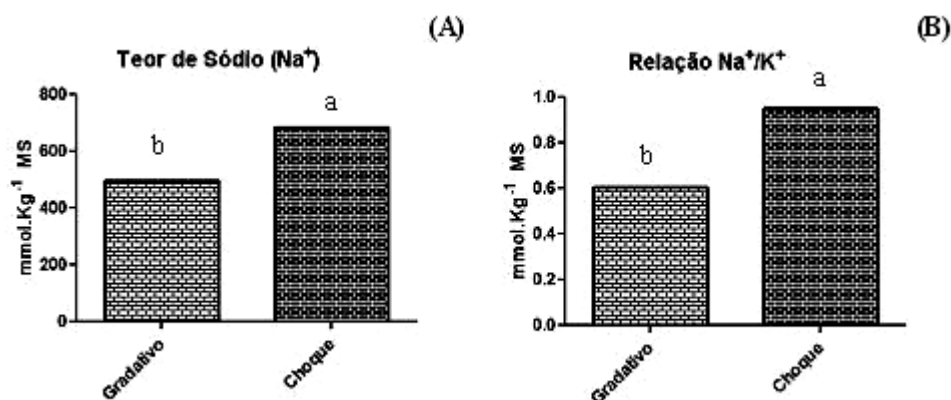


Figura 8. Teor de Na^+ e relação Na^+/K^+ em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob diferentes formas de indução do estresse salino. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na forma de indução não gradual houve maior acúmulo desse íon sugerindo que o aumento brusco na concentração de sal no meio de cultivo favorece o influxo de sódio pelas raízes, resultando em maior acúmulo de sódio na parte aérea e maior toxidez para a planta. Em trigo, o aumento repentino na concentração de NaCl causou maior acúmulo de

Na^+ e redução no crescimento do que na indução de estresse gradativo (Almansouri et al., 1999). Provavelmente, quantidades anormais de sais atinjam a parte aérea pela via apoplástica causada pela plasmólise. O transporte extra de sais para a parte aérea pode exercer um efeito tóxico por um tempo prolongado, uma vez que após atingir a parte aérea há poucas chances de ser removido (Munns, 2002).

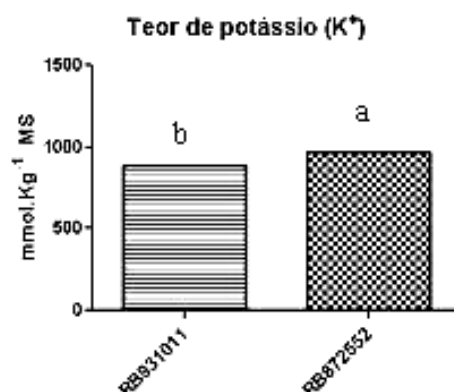


Figura 9. Teor de K^+ em duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob estresse salino. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os íons potássio desempenham um importante papel na regulação do potencial osmótico das células vegetais, além de ativar muitas enzimas envolvidas na respiração e na fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2004). No presente estudo, a salinidade reduziu os teores de potássio nas folhas das variedades analisadas. Resultados semelhantes foram encontrados em folhas de sorgo (Lacerda et al., 2001). O aumento da concentração de Na^+ no meio radicular pode inibir o influxo de K^+ evidenciando o efeito competitivo entre esses cátions.

A seletividade por esses íons está relacionada com a sensibilidade das plantas à salinidade (Willadino et al., 1999; Azevedo Neto & Tabosa, 2000).

O efeito da interação entre os níveis de NaCl e a condição de indução do estresse foi significativo para os teores de Na^+ , K^+ e Na^+/K^+ . A adição de NaCl ocasionou o acúmulo de Na^+ em relação ao controle. O acúmulo desse cátion foi superior nas plantas em que a adição de NaCl se fez de uma só vez (Figura 10A). O efeito sobre o teor de K^+ também foi mais intenso na indução de choque osmótico. Nesse caso, o teor de K^+ decresceu com o aumento da salinidade no meio de cultura, enquanto que na adição gradativa de NaCl ao meio de cultivo a concentração do cátion no tecido das plantas tratadas com sal foi inferior ao das plantas não estressadas mas não diferiu entre as plantas dos tratamentos salino (56 e 112 mM de NaCl). Plantas submetidas ao tratamento com 100 mM de NaCl aplicado gradativamente apresentaram um teor de K^+ 1,6 vezes inferior em comparação às plantas do tratamento controle, mas esse teor era maior do que nas plantas que foram submetidas à mesma concentração salina de forma repentina (Figura 10B). As alterações nos teores de Na^+ e de K^+ nos tecidos das plantas submetidas ao incremento brusco da concentração de NaCl no meio de cultivo acarretaram um incremento de nove vezes na relação Na^+/K^+ , enquanto que na forma não gradual esse aumento foi de 17,8 vezes em comparação ao controle (Figura 10C).

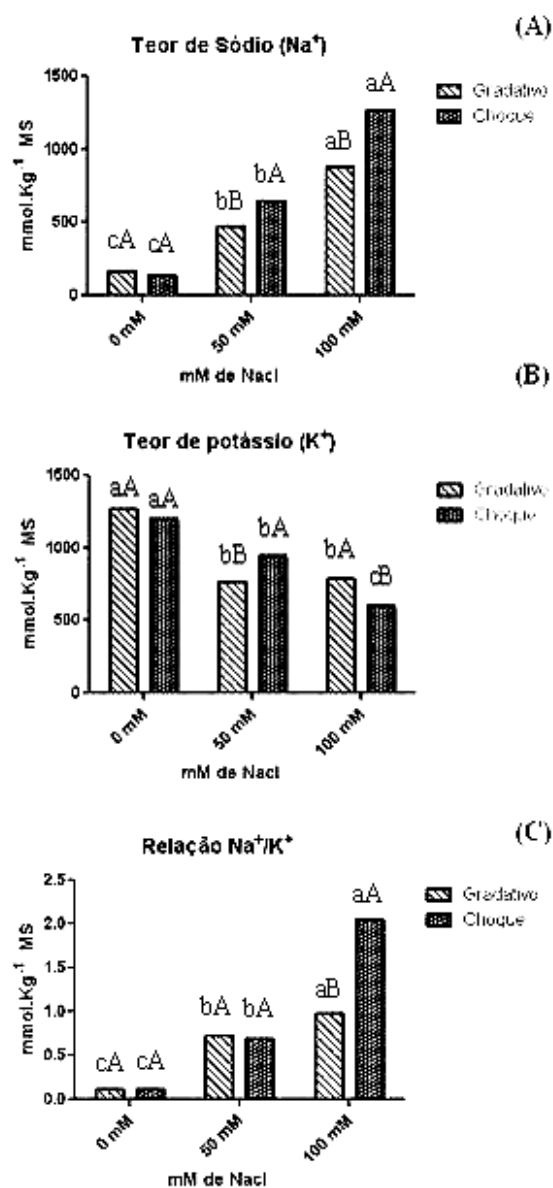


Figura 10. Teores de Na^+ , K^+ e Na^+/K^+ de duas variedades de cana-de-açúcar (RB931011 e RB872552) cultivadas *in vitro* em resposta à concentração (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM de NaCl) e à condição de aplicação (Gradativa ou Choque) do estresse salino. Letras idênticas, maiúsculas entre as condições de indução do estresse salino e minúsculas entre os níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na variedade RB872552 a relação Na^+/K^+ apresentou valor maior do que na variedade RB931011, havendo diferença a partir do tratamento de 56 mM de NaCl em relação ao controle (Figura 11).

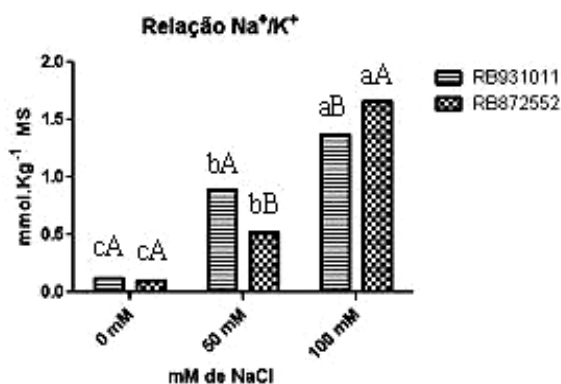


Figura 11. Relação Na^+/K^+ em duas variedades de cana-de-açúcar (RB930100 e RB872552) cultivadas *in vitro* sob dois tratamentos salinos (T1 = 56 mM e T2 = 112 mM). Letras idênticas, maiúsculas entre variedades e minúsculas entre níveis de NaCl, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A indução gradual do estresse não foi tão prejudicial à absorção do K^+ pelas raízes como a indução do estresse por choque osmótico. Storey & Wyn Jones (1978) demonstraram que o estresse salino induzido por choque osmótico acarretou maior acúmulo de Na^+ e maior efluxo de K^+ .

A adição de NaCl na concentração de 100 mM de NaCl, de uma só vez, corresponde a uma pressão de turgor da ordem de 0,5 MPa. Essa pressão é capaz de plasmolizar as células em contato com a solução salina. A plasmólise ocorre quando a pressão osmótica do meio circundante é superior a das células, cujo turgor é da ordem de 0,4 MPa. Com a plasmólise a membrana separa da parede celular e formam-se grandes espaços entre elas, e

se cria uma via apoplástica artificial, por meio da qual os sais se movem radialmente através da raiz (ou das células em contato com o meio salino). Genótipos que tenham uma elevada taxa de absorção ou não sejam capazes de uma compartimentalização vacuolar adequada desenvolvem efeitos específicos dos sais e sofrem com o acúmulo de íons tóxicos que gera um estresse adicional sobre a planta acarretam falha na produção de fotoassimilados e consequente desenvolvimento de estresse oxidativo (Munns 2002; Bratosz, 1997).

A relação Na^+/K^+ é um dos fatores intimamente relacionados ao grau de tolerância à salinidade. Desta forma, ela pode ser utilizada como índice para toxicidade de sódio, devido ao fato deste íon inibir a atividade das enzimas que requerem potássio (Greenway & Munns, 1980). Os autores reportaram, ainda, que relações Na^+/K^+ iguais ou menores que 0,6 são necessárias para uma ótima eficiência metabólica em não-halófitas. Os dados do estudo registraram um aumento da relação nas folhas de cana-de-açúcar com o incremento da salinidade. Garcia et al., (2007) e Azevedo Neto & Tabosa (2000), apresentaram resultados similares em folhas de milho. O incremento mais significativo na forma de indução não gradativa resulta na maior concentração de íons Na^+ no meio de cultivo permitindo sua maior absorção na planta devido ao choque osmótico ocasionado. O aumento da relação Na^+/K^+ indica um acréscimo na absorção de sódio, prejudicando a entrada de outros nutrientes, conduzindo a um desequilíbrio iônico nas plantas (Cusido et al., 1987). Este desequilíbrio na absorção iônica é resultado, provavelmente, da decorrente perda da integridade das membranas devido ao acúmulo de Na^+ nas raízes (Cramer et al., 1985).

A manutenção da homeostase redox é essencial para evitar que se instale o estresse oxidativo decorrente da desproporção entre formação e sequestro de espécies reativas de oxigênio. Na busca pela homeostase a planta pode lançar mão de metabólitos e enzimas, como discutido neste trabalho.

A duração e a intensidade da ação de um agente estressor, bem como a associação de mais de um fator definem a severidade do estresse e condicionam a reação das plantas. Os sensores do estresse, ou seja, os locais de uma célula onde ocorrem alterações no *status redox* e geração de ROS são responsáveis pela indução da via de ativação de genes de resposta ao estresse (Bartosz, 1997; Bray et al., 2000; Gaspar et al., 2002). Essas vias e seus produtos diferem nas células sob estresse moderado ou severo. Neste trabalho, foi possível observar diferenças nas respostas das variedades em função da condição de indução do estresse salino, gradativo ou por choque, mais do que em função das concentrações de NaCl no meio de cultura. A resposta ao estresse é, portanto, condicionada não só pela concentração salina, mas pela forma de exposição ao sal.

CONCLUSÃO

As variedades diferiram entre si em função do estresse salino induzido *in vitro*. O padrão de resposta de um genótipo ao estresse salino é condicionado não só pela concentração salina, mas pela condição de exposição ao NaCl – gradativa ou por choque osmótico. A defesa enzimática é mais responsiva pela ação da enzima ascorbato peroxidase.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, ao Centro de Tecnologias Estratégicas para o Nordeste (CETENE) pela concessão do material vegetal e à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela estrutura física para o desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; PANDEY, V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v.48, p.555-560, 2004.
- ALMANSOURI, M.; KINET, J.M.; LUTTS, S. Compared effects of sudden and progressive impositions of salt stress in threedurum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v.154, p.743–752, 1999.
- AZEVEDO NETO, A.D.; TABOSA, J.N. Avaliação de tolerância à salinidade em cultivares de milho na fase de plântula. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., Recife, 1998. **Resumos**. Recife: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 1998. p.272.
- AZEVEDO NETO, A.D.; TABOSA, J.N. Estresse salino em plantas de milho: I. Análise do crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.2, p.159-164, 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.
- BARTOSZ, Z. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.19. n.1, p. 47-64, 1997
- BEERS, J.R.; 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.
- BLUMWALD, E.; AHARON, G.S.; APSE, M.P. Sodium transport in plant cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.140-151, 2000.

BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, 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.

BOHNERT, H.J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulture**, v.78, p.237-60, 1999.

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

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN BB, GRUISSEM W, JONES RL (eds). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 2000.

CAVALCANTI, F.R.; OLIVEIRA, J.T.A.; MARTINS-MIRANDA, A.S.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v.164, p.563-571, 2004.

COSTA, P.H.; AZEVEDO NETO, A.D.; BEZERRA, M.A.; PRISCO, J.T.; GOMESFILHO, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.4, p.353-361, 2005.

CRAMER, G.R.; LÄUCHLI, A.; POLITO, V.S. Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the Plasmalemma of root cells. **Plant Physiology**, v.79, n.1, p.207-211, 1985.

CUSIDO, R.M.; PALAZON, J.; ALTABELLA, T.; MORALES, C. Effect of salinity on soluble protein, free amino acids and nicotine contents in *Nicotiana rustica* L. **Plant and Soil, Dordrecht**, v.102, p.55-60, 1987.

DEMIR, Y.; KOÇALISKAN, I. Effects of NaCl and proline on polyphenol oxidase activity in bean seedlings. **Biologia Plantarum**, v.44, p.607-609, 2001.

FATIBELO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso Analítico de Tecidos e de Extratos Brutos Vegetais como Fonte Enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.3, p.455-464, 2002.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, v.37, p.263-285, 2002.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review Plant Physiology**, v.31, p.149-90, 1980.

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.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Physiologia Plantarum**, v.57, p.315-319, 1976.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K-H. **Color Atlas of Biochemistry**, 2nd edition, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2005.

LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; RUIZ, H.A. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under nacl stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n. 3, p.270-284, 2001.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. Vol. II: **Water, radiation, salt and other stresses**. New York: Academic Press, 1980, p.25-211.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.

MANDHANIA, S.; MADAN, S.; SAWHNEY, V. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, v.50, n.2, p.227-231, 2006.

MCKERSIE, B.D.; LESHEM, Y.Y. **Stress and stress coping in cultivated plants**. Kluwer Academic Publishes: London, 1994.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.9, p.405-410, 2002.

MORITA, S.; TASAKE, M.; FUJISAWA, H.; USHIMARU, T.; TSUJI, H. A cDNA clone encoding a rice catalase isozyme. **Plant Physiology**, v.105, p.1015-1016, 1994.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239–250, 2002.

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

NELSON, D.E.; SHEN, B.; BOHNERT, H.J. Salinity tolerance-mechanisms, models, and the metabolic engineering of complex traits. **Genetic Engineering, Principles and Methods**, v.20, p.153-76, 1998.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v.49, p.249-279, 1998.

NUCCIO, M.L.; RHODES, D.; MCNEIL, S.D.; HANSON, A.D. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. **Current Opinion Plant Biology**, v.2, p.128-34, 1999.

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 Agrobiologia**, v.9, p.361-366, 2003

RAVEN, E.L. Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: what can we learn from ascorbate peroxidase? **Natural Product Reports**, v.20, p.367–381, 2003.

SAIRAM, R.K.; DESHMUKH, P.S.; SHUKLA, D.S. Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat, **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.178, p.171 - 177, 1997.

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

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

SHEEN, S.J.; CALVERT, J. Studies on polyphenol content activities and isoenzymes of polyphenol oxidase, and peroxidase during air-curing in three tobacco types. **Plant Physiology**, v.44, p.199-204, 1969.

SILVA, F.A.S. Assistência estatística – Assistat versão 7.5 beta 2008

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.

STOREY, R.; WYN JONES, R.G. Salt stress and comparative physiology in the Gramineae. I. Ion relations of two salt- and water-stressed barley cultivars, California Mariout and Arimar. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 5, p. 801–816, 1978.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3ed. Artmed, 2003. 720p.

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

TRAMONTANO, W.A.; JOUVE, D. Trigonelline accumulation in salt stressed legumes and the role of other osmoregulators as cell cycle control agents. **Phytochemistry**, v.44, n. 6, p. 1037-1040, 1997.

THIMASHEFF, S.N.; ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by solvents. In: CREIGHTON, T.E. (ed). **Protein Structure: A Pratical Approach**. Oxford. IRL Press. 1998. p.331-344.

WILLADINO, L.; MARTINS, M.H.B.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, G.; ALVES, G.D. Resposta de genótipos de milho ao estresse salino em condições hidropônicas. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p. 1209-1213, 1999.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; CAMP, W.V. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C3 plants. **The EMBO Journal**, v.16, n.16, p.4806-4816, 1997.