

EXPRESSÃO DE GENES CLOROPLASTÍDICOS E ATIVIDADE DO
FOTOSSISTEMA II EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDAS À SALINIDADE

JANICE MARIA RIBEIRO DIAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL – 2005

EXPRESSÃO DE GENES CLOROPLASTÍDICOS E ATIVIDADE DO
FOTOSSISTEMA II EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDAS À SALINIDADE

JANICE MARIA RIBEIRO DIAS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL – 2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 021/2007

Dias, Janice Maria Ribeiro

Expressão de genes cloroplásticos e atividade do fotossistema II em plantas de cana-de-açúcar submetidas à salinidade / Janice Maria Ribeiro Dias. – 2005.

86 f. : il.

Orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2006.

Bibliografia: f. 68 – 86.

1. Cana-de-açúcar 2. Salinidade 3. Expressão gênica 4. Fotossíntese 5. Fotossíntese II I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 633.61233

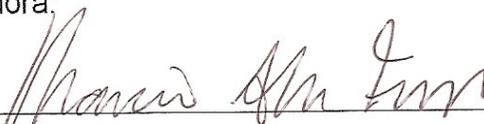
EXPRESSÃO DE GENES CLOROPLASTÍDICOS E ATIVIDADE DO
FOTOSSISTEMA II EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDAS À SALINIDADE

JANICE MARIA RIBEIRO DIAS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovada em 11 de abril de 2005.

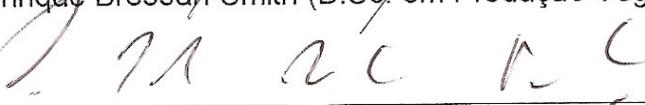
Comissão Examinadora:



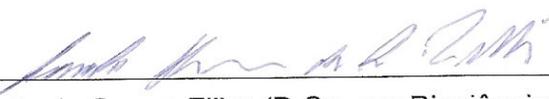
Prof. Márcio Alves Ferreira (Ph.D. em Genética) – UFRJ



Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith (D.Sc. em Produção Vegetal) – UENF



Prof. Arnaldo Rocha Façanha (D.Sc. em Química Biológica) – UENF



Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (D.Sc. em Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Orientador)

*“Nada te perturbe, nada te espante, tudo passa, só Deus não muda.
A paciência tudo alcança. Quem Deus tem, nada lhe falta. Só Deus basta.”*

Santa Teresa d'Ávila

**Dedico esta tese aos meus pais Dercílio e Cléa, que
compartilharam dos meus ideais.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a **DEUS**, pelo dom da vida, pelo seu infinito amor, pela oportunidade que mais uma vez me concedeu. Minha eterna gratidão por ter me acompanhado em todos esses anos, pois sei que só pelo seu amor foi possível chegar até aqui.

À minha querida mãezinha **Maria**, por toda intercessão e por iluminar meus caminhos obscuros, demonstrando dessa forma toda sua dedicação e amor.

Aos meus pais **Dercílio Silva Dias** e **Cléa Maria Ribeiro Athayde**, por todo carinho que dedicaram, por me fazerem acreditar em meus sonhos, por me ensinarem a aceitar as derrotas e enfrentar os desafios. Obrigada por compreenderem minha ausência e meu estresse. Enfim, obrigada por toda dedicação, confiança e oração. Amo vocês!!!

Ao meu irmão **Geison Ribeiro Dias**, pelas brigas e risadas. Reconheço e peço perdão pela minha ausência e mau humor e agradeço seu imenso esforço em me compreender. Alegre-se, essa vitória também é sua!!!

Ao professor **Gonçalo Apolinário de Souza Filho**, pela orientação constante, por toda dedicação, amizade e convívio ao longo desses anos. Meu agradecimento sincero, pois, com sabedoria, soube transmitir seu conhecimento, sabendo compreender minhas dificuldades, limitações e fracassos. A você, manifesto meu respeito, admiração e estima.

À **Beatriz dos Santos Ferreira**, por toda dedicação, ajuda e abnegação durante o desenvolvimento desse trabalho. Você dedicou seu tempo e sua experiência em função dos meus ideais. Não tenho como expressar minha gratidão por tudo que lhe devo.

Aos colegas **Karlla Salim de Queiroz, Regis Borges, Alan Trindade Branco, Ioná dos Santos Araújo, Marcela Barbosa de Figueiredo, Marcos Vinícius V. de Oliveira, Roberta Ribeiro Barbosa, Marcelo dos Santos Ferreira, Güinevere Fernandes L. S. Lima, Leandro de Mattos Pereira, Aline Chaves Intorne, Valéria Cristina L. Marques e Verônica de Souza Lima**, pelo apoio, companheirismo e pelo agradável convívio dentro e fora do laboratório.

Ao doutorando **André Carvalho**, por toda colaboração nas inúmeras tentativas de clonagem. É uma pena o PinPoint não ter nos dado uma trégua. Mas obrigada pelo estímulo nas horas de desânimo e por toda atenção. Eu ainda não desanimei... a nossa clonagem não foi um fracasso, apenas um retrocesso temporário.

Aos amigos **Inês Alves da Costa, Anna Rosa Barreto Carvalho, Viviane de Oliveira S. Cabral, Leonala da Silva, Diogo de Abreu Meireles e Gustavo Gomes Chagas**, pela companhia, pela compreensão, pelos conselhos. Enfim, obrigada por todas as alegrias e sofrimentos compartilhados. Valeu a pena!!!

A **Wallace Rudeck Sthel Cock**, por toda confiança, convivência... confiança. Obrigada pelos sorrisos e pelas lágrimas. Por ter me ensinado a conviver, a enfrentar obstáculos. Podemos divergir em nossos ideais, podemos ter gostos diferentes, mas uma realidade nos identifica... a nossa amizade.

Ao **Josil de Barros Carneiro Júnior**, por toda a ajuda e colaboração no cultivo das variedades de cana-de-açúcar.

Aos colegas de bancada **César Luís Siqueira Júnior e Hérika Chagas Madureira**, pelos momentos de descontração durante uma pipetagem e outra.

Aos técnicos **Adão Valmir dos Santos, Rívea Cristina Custódio Rodrigues e Telma Ferreira Costa**, pelos serviços prestados e pela eficiência demonstrada.

Aos professores dos Laboratórios de Biotecnologia e de Melhoramento Genético Vegetal.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

À **Universidade Estadual do Norte Fluminense**.

SUMÁRIO

Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	x
Abreviaturas e símbolos	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. A cana-de-açúcar	3
2.1.1. Histórico	3
2.1.2. Descrição botânica	4
2.1.3. Citogenética molecular	6
2.1.4. Importância econômica da cana-de-açúcar	7
2.2. O estresse salino	8
2.2.1. Mecanismos de tolerância à salinidade	11
2.2.2. Exclusão e compartimentalização iônica	13
2.3. O estresse oxidativo como uma resposta secundária à salinidade	15
2.4. Fotossíntese	16

2.5.	Os pigmentos fotossintéticos	18
2.5.1.	Clorofilas	18
2.5.2.	Carotenóides	19
2.6.	O Fotossistema II	19
2.7.	O genoma e proteoma cloroplastídico	21
2.8.	Resposta da maquinaria fotossintética a estresses ambientais	22
2.9.	A fluorescência da clorofila <i>a</i> como monitoramento do desempenho do aparelho fotossintético	24
2.10.	Identificação e análise de genes diferencialmente expressos	27
2.11.	Regulação dos genes fotossintéticos em resposta a estresses ambientais	28
3.	Objetivo	29
4.	Material e Métodos	30
4.1.	Material Vegetal	30
4.2.	Indução do estresse	31
4.3.	Análise da eficiência fotoquímica do PSII	31
4.4.	Medições da intensidade de coloração verde (clorofila)	32
4.5.	Peroxidação de lipídeos	33
4.6.	Extração de DNA genômico	33
4.7.	Seleção dos genes cloroplastídicos a serem amplificados e desenho dos iniciadores correspondentes.....	34
4.8.	Amplificação dos genes cloroplastídicos via reação em cadeia de polimerase (PCR)	36
4.9.	Extração de RNA total	36
4.10.	Northern blotting	37
4.10.	Transferência de amostras de RNA total para membrana de nylon	37
4.10.2.	Marcação da sonda	38
4.10.3.	Hibridação e exposição da membrana em filme de raio X	38
5.	Resultados	40
5.1.	Efeito do estresse salino sobre eficiência fotoquímica	40

5.1.1.	Rendimento quântico do PSII (Fv/Fm)	40
5.1.2.	<i>Quenching</i> fotoquímico (qP)	40
5.1.3.	<i>Quenching</i> não-fotoquímico (qNP)	43
5.2.	Efeito da salinidade sobre a intensidade de coloração verde da folha	45
5.3.	Alterações na peroxidação de lipídeos em plantas submetidas à estresse salino	45
5.4.	Amplificação dos genes cloroplásticos relacionados ao processo fotoquímico	48
5.5.	Caracterização parcial do perfil de expressão dos genes <i>psbA</i> , <i>psbB</i> , <i>psbC</i> e <i>psbD</i> , através da técnica de northern blotting	48
5.5.1.	Análise da expressão dos genes <i>psbA</i> , <i>psbB</i> , <i>psbC</i> e <i>psbD</i> em plantas submetidas a estresse salino	48
5.5.2.	Efeito de diferentes estresses (1 % NaCl, 15 % PEG, 1 % KCl e Ferimento) sobre a expressão dos genes <i>psbA</i> , <i>psbB</i> , <i>psbC</i> e <i>psbD</i>	54
5.5.3.	Efeito da temperatura sobre a expressão dos genes <i>psbA</i> , <i>psbB</i> , <i>psbC</i> e <i>psbD</i>	54
6.	Discussão	59
7.	Conclusão	66
8.	Referências Bibliográficas	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração das principais partes da cana-de-açúcar	5
Figura 2 - O Fluxo de elétrons durante a fotossíntese na membrana tilacoidal ...	17
Figura 3 - Esquema representativo do complexo de proteínas do fotossistema II e seus cofatores	20
Figura 4 - Cinética da emissão de fluorescência	24
Figura 5 - Cultivares de cana-de-açúcar monitoradas em câmara climática	31
Figura 6 - Monitoramento da eficiência fotoquímica do fotossistema II	32
Figura 7 - Efeito do estresse salino sobre a eficiência quântica (Fv/Fm).....	41
Figura 8 - Efeito do estresse salino sobre o <i>quenching</i> fotoquímico (qP)	42
Figura 9 - Efeito do estresse salino sobre o <i>quenching</i> não-fotoquímico (qN)	44
Figura 10 - Alterações na intensidade da coloração verde em plantas submetidas à estresse salino	46
Figura 11 - Efeito da salinidade sobre a peroxidação de lipídeos	47
Figura 12 - Amplificação dos genes cloroplastídicos correspondentes ao fotossistema II	49
Figura 13 - Amplificação dos genes cloroplastídicos correspondentes ao citocromo b ₆ f	50

Figura 14 - Amplificação dos genes cloroplastídicos correspondentes ao fotossistema I	51
Figura 15 - Amplificação dos genes cloroplastídicos correspondentes a ATPsintase	52
Figura 16 - Expressão diferencial dos genes psbA, psbB, psbC e psbD em duas cultivares de cana-de-açúcar (RB72454 e CB4789) submetidas a 1 % de NaCl durante 24 horas	53
Figura 17 - Expressão diferencial dos genes psbA, psbB, psbC e psbD em plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de NaCl (0,5 %; 1,0 % e 1,7 % de NaCl) durante 24 horas	56
Figura 18 - Expressão diferencial dos genes psbA, psbB, psbC e psbD em plantas de cana-de-açúcar (cv. RB72454) expostas a diferentes estresses (1,0 % NaCl, 15 % PEG, 1,0 % KCl e Ferimento	57
Figura 19 - Expressão diferencial dos genes psbA, psbB, psbC e psbD em plantas de cana-de-açúcar (cv. RB72454) expostas a alta temperatura (44 °C) e baixa temperatura (6 °C)	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Produção de cana-de-açúcar no Norte Fluminense em culturas irrigadas e não irrigadas	9
Tabela 2 - Dados de irrigação e drenagem fornecidos pela FAO; CROP WATER/REQUIREMENT	10
Tabela 3 - Produção de cana-de-açúcar na Região Sudeste	11
Tabela 4 – Exemplos de genes de resposta a estresses ambientais.....	12

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
ABA	Ácido abscísico
APX	Ascorbato peroxidase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CB	Campos Brasil
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO_2	Dióxido de carbono
Cytb_{6f}	Citocromo b_{6f}
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desóxi nucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido acético etileno tetra diamino
ESTs	“Expressed sequence tags”
F_0	Fluorescência inicial
F_m	Fluorescência máxima
F_v	Fluorescência variável
F_v/F_m	Eficiência fotoquímica do PSII
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio

KCl Cloreto de potássio
LHC Complexo coletor de luz
MDA Malonaldeído
NaCl Cloreto de sódio
O ₂ ⁻ Superóxido
PCR Reação em cadeia de polimerase
PEG Polietilenoglicol
PM Peso molecular
PSI Fotossistema I
PSII Fotossistema II
PVPP Poli vinil poli pirrolidina
qN Quenching não fotoquímico
qP Quenching fotoquímico
RB República do Brasil
RNA Ácido ribonucléico
RNAse Ribonuclease
ROS Reactive Oxygen Species
SDS Lauril sódio dodecil sulfato
SOD Superóxido dismutase
SPAD Soil Plant Analyser Development
SSC Solução de cloreto de sódio e cloreto de citrato
TBA Ácido tio-barbitúrico
TBARS Espécies reativas ao ácido tio-barbitúrico
TCA Ácido tricloroacético
UFRRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro
UPOV Union pour la protection dês Obtentions Végétaux

RESUMO

DIAS, Janice Maria Ribeiro; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; abril de 2005. Expressão de genes cloroplastídicos e atividade do fotossistema II em plantas de cana-de-açúcar submetidas à salinidade. Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho. Conselheiros: Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith e Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira.

Diversos trabalhos têm demonstrado o efeito da salinidade sobre características fisiológicas, bioquímicas e moleculares em plantas. Nesse trabalho foram utilizadas duas cultivares de cana-de-açúcar (RB72454 e CB4789) com objetivo de avaliar o efeito do estresse salino sobre a eficiência fotoquímica, os teores de clorofila, bem como os níveis de peroxidação de lipídeos. Para a indução do estresse utilizou-se 1 % e 1,7 % de NaCl. Adicionalmente, 26 genes cloroplastídicos, envolvidos no processo de absorção e transferência de energia, componentes do PSII, Cytb₆f, PSI e ATPase, foram selecionados. Esses genes foram amplificados via reação em cadeia de polimerase, sendo que quatro desses, que codificam proteínas componentes do PSII (*psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD*), foram utilizados em trabalhos de “northern blotting”. Os resultados demonstraram que os níveis de estresse impostos às plantas não ocasionaram a diminuição dos valores Fv/Fm (rendimento quântico do PSII). Observa-se uma pequena alteração do *quenching* fotoquímico (qP) de ambas cultivares. Para as

características de *quenching* não-fotoquímico e intensidade de coloração de verde na folha foram verificadas oscilações em ambas variáveis. Uma outra alteração proeminente foi a peroxidação de lipídeos. Quando foram aumentados o nível de estresse e o tempo de exposição ocorreu um acréscimo nos níveis de espécies reativas ao tio-barbitúrico, sendo que a cv. CB4789 apresentou maiores níveis de peroxidação em relação à cv. RB72454. A amplificação dos genes cloroplastídicos de cana-de-açúcar, com a utilização dos iniciadores desenhados a partir do plastoma de arroz, foi bastante eficiente, evidenciando a homologia entre os genomas cloroplastídicos de arroz e cana-de-açúcar. Com relação às análises de “northern blotting” foi verificado que os genes estudados apresentaram regulação diferencial em resposta aos estresses com NaCl, PEG, KCl, Ferimento e Temperatura. Para a cv. RB72454 foi observada a repressão dos quatro genes em resposta ao NaCl, em discordância com o observado para o gene *psbA* da cv. CB4789, onde verificou-se um aumento dos níveis de transcritos. Os resultados fornecidos pelo ensaio com PEG mostraram que os genes comportaram-se de forma semelhante ao estresse com NaCl. Porém, para o estresse com KCl foi verificado comportamento oposto, com indução dos genes. O estresse por ferimento não provocou alterações na expressão dos genes *psbA*, *psbC* e *psbD*, em oposição a aparente indução de *psbB*. Com relação ao estresse por temperatura, verificou-se que o calor teve ação repressora para os genes *psbA*, *psbB* e *psbD*, o que não ocorreu com o gene *psbC*, que foi regulado somente em resposta ao frio. Adicionalmente, os genes *psbC* e *psbD* mostraram estar co-regulados durante os estresses por NaCl, PEG, KCl e Ferimento. Em resposta a temperaturas extremas esses genes apresentaram co-regulação independentes. Os resultados obtidos nesse trabalho possibilitarão um maior entendimento dos mecanismos fisiológicos e moleculares da cana-de-açúcar em resposta a estresses.

ABSTRACT

DIAS, Janice Maria Ribeiro; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; abril de 2005. Chloroplast genes expressions and activity of photosystem II in sugarcane plants submitted to salinity. Advisor: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho. Co-advisor: Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith e Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira.

Several researches have demonstrated the effect of salinity on physiological, biochemical and molecular characteristics of plants. In this work, two cultivars of sugarcane were utilized (RB72454 e CB4789) with the aim to verify the effect of salt stress on photochemical efficiency, chlorophyll content and lipid peroxidation as well. For induction of the stress was utilized 1 % and 1,7 % of NaCl. In addition, 26 chloroplast genes involved in the process of energy absorption and transfer, which are components of PSII, Cytb₆f, PSI e ATPase were selected. These genes were amplified by polimerase chain reaction, and four of these genes, that codifying proteins that compose the PSII (*psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD*), were utilized in the work of northern blotting. The results demonstrated that the levels of the stress imposed to the plants do not provoked reduction of Fv/FM (quantum yield) values. We observed a small change on the photochemical quenching (qP) of both cultivars. To the characteristics of the non-photochemical

quenching and green color intensity on leaves were verified oscillations in both variables. Another prominent change was the lipid peroxidation. The level of stress and time of exposition were risen were observed an addition to the levels of reactive species to thiobarbituric acid. The cultivar CB4789 presented higher levels of lipid peroxidation in consideration to the cultivar RB72454. The amplification of chloroplast genes from sugarcane by the use of primers designed from rice plastome was successfully, evidencing the homology among the chloroplast genes of rice and sugar cane. With relation to the analyses of northern blotting, it was verified that the studied genes presented differential regulation in response to the stresses with NaCl, PEG, KCl, Wounding and Temperature. To the cultivar RB72454 was observed the repression of the four genes in response to NaCl, in contrast to response observed to the *psbA* gene of cultivar CB4789, in which was verified an increment of transcripts levels. The results obtained to the assays with PEG demonstrated that the genes had similar pattern of expression in comparison to NaCl. However, to the KCl stress was verified opposing expression, it means, with induction of expression to the genes. The wounding stress does not provoke changes on the expression of the genes *psbA*, *psbC* and *psbD*, in opposition to an apparent induction of *psbB*. With regard to the temperature stress was verified that the heat had a repressive action on the genes *psbA*, *psbB* and *psbD*, what was not observed to the *psbC* gene which was only regulated in response to cold. Additionally the *psbC* and *psbD* genes showed to be co-regulated during the stresses with NaCl, PEG, KCl and wounding. In responses to extremes temperatures, these genes presented independent co-regulation. The results obtained in this work make possible a better interpretation of physiological and molecular mechanisms of the sugarcane in responses to stresses.

1. INTRODUÇÃO

A região Norte Fluminense tem como uma de suas principais atividades econômicas a indústria agroaçucareira, tendo gerado no ano de 2000 cerca de 175 milhões de reais e cerca de 15.000 empregos diretos e indiretos (Azevedo, 2002).

A produção canavieira no Estado do Rio de Janeiro teve seu crescimento acentuado a partir de 1930, tornando a região uma das grandes produtoras nacionais. Na década de 70, os lançamentos do Proálcool e do Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR) instalado em Campos dos Goytacazes elevaram ainda mais a produção, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento da Região Norte Fluminense.

Entretanto, nas últimas três décadas, essa atividade vem passando por um processo de declínio em função de sucessivos planos econômicos, desvalorização da moeda nacional em relação ao dólar, fortes pressões competitivas impostas pelo mercado, que exige produtividade e qualidade a custos cada vez menores e, principalmente, a falta de cultivares de cana-de-açúcar adaptadas ao déficit hídrico e aos solos salinos comumente encontrados na região.

Essas condições adversas impostas às plantas podem induzir alterações estruturais, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Em conjunto, todas essas respostas estão envolvidas no mecanismo de adaptação ao agente estressante.

Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho estudar o efeito do estresse salino sobre duas cultivares de cana-de-açúcar, através de análises da eficiência fotoquímica e peroxidação de lipídeos e, assim, avaliar as diferenças na tolerância entre as variedades analisadas. Adicionalmente, foram amplificados genes cloroplásticos relacionados ao processo fotoquímico, via reação em cadeia de polimerase. Dentre esses, quatro genes responsáveis por codificar o complexo protéico macromolecular D1/D2/CP43/CP47, pertencentes ao fotossistema II, tiveram sua expressão gênica analisada através de northern blotting”.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cana-de-açúcar

2.1.1. Histórico

A região de origem presumível da cana-de-açúcar é o norte da Índia, de onde supõe-se que tenha sido levada para a China e o Oriente Próximo. Os árabes a transportaram para o norte da África e o sul da Europa, e os chineses a introduziram em Java e nas Filipinas. Cristóvão Colombo trouxe a cana para a América em sua segunda viagem, começando o seu plantio no ano de 1494, em São Domingos. Daí foi levada para Cuba, Antilhas e o continente, iniciando-se o seu cultivo nos Estados Unidos da América, no Estado de Louisiana (Leme Júnior e Borges, 1965). No Brasil, a cultura teve início em 1532, na capitania de São Vicente, trazida por Martim Afonso de Souza, com canas oriundas da Ilha da Madeira (Fernandes, 1984).

Acredita-se que o primeiro engenho do Brasil foi o que Jerônimo de Albuquerque estabeleceu em Olinda, em 1540, com a denominação de Nossa Senhora da Ajuda. Por volta de 1590 haviam seis engenhos na capitania de São Vicente, 36 na da Bahia e 66 na de Pernambuco (Leme Júnior e Borges, 1965).

2.1.2. Descrição botânica

- Reino*Plantae*
- Subreino*Tracheobionta*
- Superdivisão*Spermatophyta*
- Divisão*Magnoliophyta*
- Classe *Liliopsida*
- Subclasse*Commelinidae*
- Ordem *Poales*
- Família *Poaceae*
- Gênero *Saccharum*

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae e é a única representante da Ordem Poales, a qual se caracteriza por apresentar flores pequenas, praticamente destituídas de perianto e protegidas por brácteas e bracteolas secas, reunidas em típicas inflorescências. O fruto é seco do tipo cariopse e com semente de endosperma abundante (Paranhos, 1987).

O gênero *Saccharum* é um dos mais importantes economicamente para o homem, apresentando extraordinária organização e complexidade de estruturas florais. A cana-de-açúcar é uma planta perene, desenvolvendo-se em touceiras, normalmente de 3 a 5 m de altura. Possui caule do tipo colmo com internódios (nós e internós), sendo este cilíndrico, de cores variáveis. As folhas nascem dos nós e possuem bainha, com lígula na base dos limbos. Serrilhadas ou não, as folhas são sulcadas longitudinalmente por uma nervura larga e branca e ao lado dessa se encontram as nervuras paralelinérveas. Apresenta inflorescência do tipo panícula terminal, contendo flores hermafroditas. Esse órgão aparece após o segundo ano de plantio; sendo de cor branca prateada, plumosa, paniculada. (Lima, 1984).



Figura 1- Ilustração das principais partes da cana-de-açúcar. 1-Inflorescência do tipo panícula terminal. 2-Folha apresentando nervura paralelinérvea. 3-Bainha. 4-Nós e internós. 5-Caule do tipo colmo apresentando internódios.
<http://www.illustratedgarden.org/mobot/rarebooks/page.asp?relation=QK99A1K6318831914B2&identifier=0684> (Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germânica).

Ao longo dos anos, muitos estudos foram realizados utilizando-se os indivíduos desse gênero. Foram consideradas características vegetativas, produtividade, resistência à pragas e moléstias, adaptações a determinados ambientes, justificando dessa forma a denominação de novas cultivares (Paranhos, 1987).

Em 1927, havia aproximadamente 30 espécies registradas para o gênero *Saccharum* (Leme Júnior, 1965), porém algumas pesquisas constataram que as cultivares atuais são híbridas interespecíficas, resultantes do cruzamento entre as espécies *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum robustum* Jewiet (Malhotra, 1995), *Saccharum barberi*, *Saccharum edule* e *Saccharum sinensi*. Em todo o mundo cultivam-se esses híbridos, entre os quais podem ser

citados os grupos de híbridos: CB – Campos-Brasil, IAC – Instituto Agrônômico de Campinas e RB – República do Brasil (Leme Júnior e Borges, 1965).

Essas variedades atualmente disponíveis foram obtidas após criteriosos trabalhos de melhoramento genético realizados por diferentes grupos de pesquisa. Cada variedade desenvolvida recebeu uma sigla e um número de ordem. A sigla corresponde ao nome da estação experimental, do país ou da região onde foi adquirida a variedade, enquanto que o número de ordem nos indica o ano de obtenção e/ou o número do experimento. Por exemplo, a variedade IAC-51/205: a sigla IAC significa Instituto Agrônômico de Campinas e o número 51 nos fornece o ano de obtenção, 1951; enquanto a posição da planta no experimento é 205 (Fernandes, 1984).

A nova cultivar deve ter seu pedido de registro encaminhado ao RNC (Registro Nacional de Cultivar), suprimindo detalhadas informações sobre a identidade da variedade, como também apresentar provas experimentais de que a mesma contém condições suficientes para ser considerada benéfica para agricultores e consumidores. Os critérios de avaliação são baseados no compilamento de regras agrupadas pela UPOV (Union pour la Protection des Obtentions Végétaux). A UPOV é uma organização intergovernamental, com sede em Genebra (Suíça), baseada na Convenção Internacional para a Proteção de Novas Variedades de Plantas, que foi assinada em 2 de dezembro de 1961, em Paris. As leis aprovadas na convenção foram revisadas em 1972, 1978 e 1991. O Brasil tornou-se membro da UPOV em 23 de maio de 1999 e é signatário da revisão de 1978 (Momsen, 2002).

2.1.3. Citogenética molecular

A cana-de-açúcar possui um grande tamanho de genoma, apresentando 7440 mega pares de base (Mpb) (Arruda, 2001). Uma importante característica de seu genoma é a presença de um alto grau de ploidia (Sreenivasan *et al.*, 1987). Por meio da hibridização de cromossomos *in situ* foi possível mostrar que a *Saccharum officinarum* possui usualmente o número haplóide de cromossomos $n=10$. No caso da *Saccharum spontaneum*, o número haplóide de cromossomos é de $n=8$. Acredita-se que o nível de ploidia no gênero *Saccharum* varia entre $x=5$ a 16 (D'Hont *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 1999).

Clones de *S. officinarum* geralmente apresentam cromossomos $2n=80$. Para *S. spontaneum*, tem sido descrito que seu número pode variar entre $2n=40$ a 128. Porém, as cultivares atuais apresentam $2n=100$ a 130, indicando que a aneuploidia (alteração no número de cromossomos) é comum no gênero *Saccharum* (Arruda, 2001).

2.1.4. Importância econômica da cana-de-açúcar

A agroindústria açucareira é a mais antiga atividade agro-industrial do Brasil e está relacionada a alguns dos principais eventos históricos do país. Atualmente, o Brasil e a Índia são os maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar. O Brasil é isoladamente o maior produtor de açúcar e de álcool e o maior exportador mundial de açúcar (Azevedo, 2002), tendo um custo de produção de US\$ 170,00 por tonelada de açúcar.

Os países concorrentes mais próximos do Brasil são a Austrália com um custo de produção de US\$ 270/tonelada e a Tailândia com custo de US\$ 310/tonelada. Os custos de produção do açúcar na Europa e nos EUA são superiores a US\$ 500/tonelada, com a produção de açúcar fortemente subsidiada. Segundo Pinazza e Alimandro (2001), o açúcar é o produto de maior sucesso no agrobusiness brasileiro. Com o aumento da produção ao longo dos anos, as exportações a partir da safra 1995/96 saltaram de 8% para 30% do total comercializado no mercado internacional. Em 2000, o setor agroaçucareiro gerou cerca de 1,5 milhão de empregos diretos e indiretos, sendo 613 mil empregos diretos e 966 mil empregos indiretos, distribuídos por quase todos os Estados brasileiros.

Anualmente, cerca de 270 milhões de toneladas de cana são processados no Brasil. Para isso, são cultivados 5 milhões de hectares, localizados principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Sul, representando cerca de 8% das terras sob agricultura (Döbereiner e Baldini, 1998).

Essa alta eficiência de produção alcançada pelo produtor brasileiro vem de uma longa tradição na produção de cana e açúcar, de aproximadamente cinco séculos. Isso se deve também ao esforço conjunto em pesquisas, criando novas variedades resistentes à pragas e doenças, com maior teor de sacarose e

aclimatadas a diferentes condições edafoclimáticas, numa evolução que tende a se acelerar com o advento do projeto genoma da cana-de-açúcar.

Os produtos e subprodutos da cana-de-açúcar têm uma ampla variedade de aplicações. No setor da alimentação humana, são enormes as suas utilizações, como o uso do açúcar. O álcool produzido a partir da cana-de-açúcar é utilizado nas indústrias farmacêuticas e de variadas bebidas, bem como na produção de biocombustível (Lima, 1984).

Com a crescente preocupação da sociedade mundial sobre o uso dos combustíveis fósseis, vários países estão buscando reduzir ao máximo o uso dos mesmos, seja pela substituição do produto ou pela adição de outros combustíveis para diminuir a carga poluidora (Maule *et al.*, 2001). Dessa forma, a cana-de-açúcar vem a ser uma das melhores opções entre as fontes de energia renováveis, inserindo a agricultura brasileira neste cenário e apresentando um futuro promissor.

2.2. O estresse salino

A salinidade do solo é um dos principais fatores limitantes na agricultura mundial (Allakhverdiev *et al.*, 2000), que vem sendo agravado por práticas agrícolas, como por exemplo, manejos de irrigação inadequados. Sabe-se que o desenvolvimento das técnicas de irrigação tem causado numerosos casos de salinização. Dos 270 milhões de hectares irrigados, 110 milhões (40%) estão localizados em regiões áridas, porém 60% dessa irrigação é praticada em regiões de clima tropical e sub-tropical (Smedema e Shiati, 2002).

Devido ao acúmulo de sal no solo, a salinidade causa um decréscimo no potencial osmótico do vegetal, resultando em estresse hídrico. Adicionalmente, o estresse iônico é também ocasionado em plantas expostas ao sal, principalmente o Na e o Cl (Ueda *et al.*, 2003).

A cana-de-açúcar apresenta elevado consumo de água, necessitando de 250 partes de água para formar uma parte da matéria seca da planta (Dillewijn, 1952). Sua irrigação só é cessada antes da colheita para reduzir a compactação do solo, facilitando o uso de máquinas agrícolas e para aumentar o teor de sacarose (Robertson *et al.*, 1998). Assim, a disponibilidade de água é um fator limitante na produção agrícola, tornando-a dependente parcial ou total da

irrigação (Tabela 1) (Tilley e Chapman, 1999). Esse fato tem tornado a pesquisa na área de estresse salino como alvo no melhoramento vegetal (Zhu, 2001).

Tabela 1- Produção de cana-de-açúcar no Norte Fluminense em culturas irrigadas e não irrigadas.

Fazenda	Irigada		Não irrigada		Cultivar
	T/ha	T/ha/mês	T/ha	T/ha/mês	
Airizes	90,0	7,2	27,0	2,0	CB45-3
Degredo	101,0	7,5	71,0	4,4	CB45-3
Thai	110,0	7,3	36,0	2,0	CP51-22
Baronesa	153,6	—	82,8	—	CB-45-3
Baronesa	129,7	—	77,4	—	CP51-22
Baronesa	130,0	—	65,1	—	NA56-79
Partido	170,3	—	66,5	—	CB45-3
Partido	150,0	—	62,7	—	CP51-22
Partido	153,5	—	71,6	—	NA56-79

Fonte: Anais do II Congresso Nacional da Sociedade de Técnicos Açucareiros do Brasil Vol.III/IV. Pág.388

A salinidade no solo também pode ocorrer naturalmente, principalmente em regiões costeiras, onde o lençol freático freqüentemente é contaminado pela água do mar. Muitas vezes, a recuperação destes solos é economicamente inviável (Smith *et al.*, 1994).

O estresse salino provoca uma série de mudanças nas funções biossintéticas básicas, incluindo fotossíntese, fotorrespiração e síntese de aminoácidos e carboidratos (Kawasaki *et al.*, 2001; Ozturk *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002). Essas alterações metabólicas resultam no declínio da produtividade.

Em condições de campo, a salinidade da água do solo ou da água de irrigação é medida com uso de condutivímetro ou de osmômetro. A condutividade da água depende da concentração de íons nela dissolvidos. Quanto maior o nível de salinidade, maior será a condutividade elétrica e menor será o potencial osmótico. De acordo com Ayers e Westcot (1976), a cana-de-açúcar apresenta considerável sensibilidade ao estresse salino (Tabela 2) quando comparada com as demais espécies analisadas, com exceção somente do feijão, milho e repolho. Na tabela abaixo pode-se verificar que com a condutividade elétrica do extrato de

saturação do solo (CEes) igual a 3, 5 e 8,5 a perda na produtividade de cana-de-açúcar foi de 10, 25 e 50%, respectivamente.

Tabela 2 - Produtividade potencial de algumas culturas agronomicamente importantes, submetidas a diferentes condições de salinidade. Dados de irrigação e drenagem fornecidos pela FAO; CROP WATER/REQUIREMENT (Ayers e Wescot, 1976).

	Produtividade Potencial									
	100%		90%		75%		50%		0%	
	CEes	CEi	CEes	CEi	CEes	CEi	CEes	CEi	CEes (máximo)	
CEVADA	8,0	5,3	10,0	6,7	13,0	8,7	12,0	18,0	28	
FEIJÃO	1,0	0,7	1,5	1,0	2,3	1,5	3,6	2,4	07	
MILHO	1,7	1,1	2,5	1,7	3,8	2,5	5,9	3,9	10	
→ CANA AÇÚCAR **			3,0		5,0		8,5			
ALGODÃO	7,7	5,1	9,6	6,4	13,0	8,4	17,0	12,0	27	
AMENDOIM	3,2	2,1	3,5	2,4	4,1	2,4	4,9	3,3	07	
ARROZ INUNDADO	3,0	2,0	3,8	2,6	5,1	3,4	7,2	4,8	12	
GIRASSOL	5,3	3,5	6,2	4,1	7,6	5,0	9,9	6,6	15	
SORGO	4,0	2,7	5,1	3,4	7,2	4,8	11,0	7,2	18	
SOJA	5,0	3,3	5,5	3,7	6,2	4,2	7,5	5,0	10	
TRIGO	6,0	4,0	7,4	4,9	9,5	6,4	13,0	8,7	20	
BETERRABA	4,0	2,7	5,1	3,4	6,8	4,5	9,6	6,4	15	
BROCOLI	2,8	1,9	3,9	2,6	5,5	3,7	8,2	5,5	14	
REPOLHO	1,8	1,2	2,8	1,9	4,4	2,9	7,0	4,6	12	
MELÃO (CANTALOUPE)	2,2	1,5	3,6	2,4	5,7	3,8	9,1	6,1	16	

CEes = Cond. Elet. do extrato de saturação do solo em mmhos/cm ou dS/m.

CEi = Cond. Elet. da água de irrigação em dS/m

Os Estados da região Sudeste são importantes produtores de cana-de-açúcar, contribuindo em conjunto com quase 30% da safra brasileira. Entretanto, como pode ser observado na tabela 3, o Estado de São Paulo concentra a maioria das lavouras de cana-de-açúcar, apresentando cerca de 50 mil produtores e 308 unidades de processamento industrial, produzindo 17,7 milhões de toneladas de açúcar e 13,7 milhões de m³ de etanol por ano (Saciloto, 2003). De acordo com a tabela a seguir, apesar de o Estado do Rio de Janeiro possuir uma longa tradição no cultivo de cana-de-açúcar, sua produção é baixa quando comparada aos Estados de Minas Gerais e São Paulo.

Tendo em vista de que grande parte da cultura canavieira no Brasil, principalmente na região Norte Fluminense, está distribuída em áreas litorâneas, a cana-de-açúcar também é afetada pela salinidade. Isso se deve ao fato de a cultura passar por deficiências hídricas, dependendo da irrigação e devido a

possíveis contaminações do lençol freático pela água do mar. Como resultado, ocorre uma queda na produção.

Tabela 3 - Produção de cana-de-açúcar na Região Sudeste.

Estados/Safra	CANA (em toneladas)					
	98/99	(%)	99/00	(%)	00/01	(%)
Minas Gerais	13.483.617	4,28	13.599.488	4,43	10.634.653	4,21
Espírito Santo	1.942.022	0,62	2.126.902	0,69	2.554.166	1,01
Rio de Janeiro	5.191.421	1,65	4.953.176	1,61	3.934.844	1,56
São Paulo	199.521.253	63,35	194.234.474	63,28	148.226.228	58,73
Brasil	314.969.182	100,00	306.965.623	100,00	252.373.659	100,00

Fonte: UNICA/MDIC-DAA - <http://www.nuca.ie.ufrj.br/infosucro/>

2.2.1. Mecanismos de tolerância à salinidade

As plantas desenvolvem uma série de mecanismos moleculares e bioquímicos em resposta ao estresse salino (Parida e Das, 2005). A maioria das plantas pode se adaptar a níveis de salinidade baixos e moderados, contudo, seu crescimento é severamente limitado a 200 mM de NaCl (Hasegawa *et al.*, 2000).

Os mecanismos de tolerância ao sal são divididos em mecanismos pouco complexos e altamente complexos. Os mecanismos pouco complexos envolvem mudanças em algumas vias bioquímicas. No caso dos mecanismos altamente complexos, estão envolvidos em processos como a fotossíntese e a respiração, aumento da eficiência no uso da água (Botella *et al.*, 1994), metilação do DNA, entre outros (Walbot e Cullis, 1985). Acredita-se que para a proteção através dos processos altamente complexos é necessário que os mecanismos pouco complexos sejam induzidos coordenadamente (Bohnert *et al.*, 1995).

Neste contexto, vários genes são envolvidos. Esses genes são responsáveis por codificar proteínas de resposta ao sal (Tabela 4), que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro grupo inclui proteínas que provavelmente respondem ao estresse, no intuito de combatê-lo. Como exemplo, podemos citar enzimas requeridas na biossíntese de osmólitos, chaperoninas, proteínas LEA (Late embryogenesis abundant), proteínas ligadoras de mRNA, transportadores

de íons, transportadores de açúcar e prolina, enzimas antioxidantes, proteases, e reguladores vegetais, como o ABA (Bohnert e Jensen, 1996; Ingram e Bartels, 1996; Seki *et al.*, 2002). O segundo grupo inclui proteínas que estão envolvidas na regulação da transdução de sinais e expressão de genes que provavelmente são regulados para responder ao estresse – como proteínas quinases, fatores de transcrição e enzimas do metabolismo de lipídios (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Tabela 4 – Exemplos de alguns genes de resposta a estresses ambientais. (Adaptado de Cushman e Bohnert, 2000)

Compostos e proteínas	Exemplos	Possíveis modos de ação
Osmoprotetores	Aminoácidos (prolina, ectoína) Compostos dimetil sulfonados (glicina-betaína) Polióis (manitol, sorbitol) Açúcares (sacarose, trealose)	Ajuste osmótico, proteção da membrana celular e proteção contra espécies reativas de oxigênio
Moléculas de resposta à estresse oxidativo	Enzimas (catalase, glutatona redutase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase, oxidase alternativa) Compostos não enzimáticos (ascorbato, carotenóides, antocianinas)	Desintoxicação celular
Proteínas de estresse	Proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant)	Estabilização de proteínas e da membrana, redução de estresse hídrico
Proteínas Heat shock (HSP)	Proteínas de resposta a sal, frio, calor, localizadas em diferentes compartimentos subcelulares (chaperonina)	Modulação traducional, prevenção do dobramento incorreto de proteínas
Transportadores de prótons e íons	Transportadores de K^+ , Na^+ , H^+ ATPases, Na^+/H^+ antiporter	Remoção e seqüestro de íons tóxicos do citosol, formação do gradiente de prótons
Moléculas responsáveis por manter a fluidez da membrana	H^+ ATPase, Na^+/H^+ antiporter, desaturases de ácidos graxos	Aumento da fluidez da membrana
Transporte hídrico	Aquaporinas (CIP, TIP, PIP)	Relações hídricas, abertura e fechamento estomático
Moléculas de sinalização	MAP quinases, quinases Ca^{2+}	Sinalização celular

celular	dependente, fosfatases, sensores de Ca ⁺ (SOS3)	
Fatores de transcrição	EREBP, DREB, zinc finger	Regulação da transcrição gênica
Reguladores de crescimento	Ácido abscísico, etileno, brassinosteróides, poliaminas, citocininas	Homeostase hormonal e regulação gênica

2.2.2. Exclusão e compartimentalização iônica

A exclusão e compartimentalização iônica não apenas são cruciais para o crescimento da planta em condições normais, como também são importantes no crescimento vegetal em condições salinas (Adams *et al.*, 1992), devido ao controle do distúrbio para que ocorra a homeostase dos íons.

Os íons Na⁺, que são abundantes em solos salinos, são citotóxicos em plantas, quando estes se acumulam em altas concentrações. Na⁺ entra na célula vegetal através de transportadores, como HKT1 (Rus *et al.*, 2001), e por meio de canais não seletivos (Amtmann e Sanders, 1999). Então, para prevenir o aumento de Na⁺ no citosol, as células vegetais exsudam os íons tóxicos para o apoplasto e/ou os compartimentalizam no vacúolo (Apse *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2002).

O mecanismo de exclusão de Na⁺ depende de um gradiente eletroquímico gerado por uma proteína de membrana denominada H⁺-ATPase. Essa proteína bombeia prótons H⁺ para o exterior da célula utilizando a energia da hidrólise de uma molécula de ATP, gerando o gradiente eletroquímico. Tal gradiente produz a força próton-motriz necessária ao antiporter Na⁺/H⁺, promovendo o transporte de um íon H⁺ a favor de seu gradiente eletroquímico, para o interior da célula. Concomitantemente, ocorre o transporte de um íon Na⁺ contra o gradiente, para o meio extracelular (Blumwald *et al.*, 1999).

As proteínas antiporter de Na⁺/H⁺ promovem o transporte de sódio para o interior do vacúolo utilizando a energia do gradiente eletroquímico gerado por enzimas vacuolares que translocam H⁺. Essas bombas eletrogênicas coexistem no vacúolo e são denominadas H⁺-ATPases (V-ATPase) e H⁺-PPases (V-Ppase – pirofosfatase vacuolar) (Blumwald *et al.*, 1987; Dietz *et al.*, 2001).

As V-ATPase são bombas eletrogênicas dominantes nas endomembranas da maioria dos vegetais, sendo indispensáveis para o crescimento da planta em condições normais, bem como em condições de estresse. Isso se deve ao fato de seu papel ser fundamental no transporte primário dependente de energia, na manutenção da homeostase de solutos, facilitando, possivelmente, a fusão de vesículas (Parida e Das, 2005).

Quando submetido ao estresse salino, um dos desafios do vegetal é manter altas concentrações de K^+ e baixas concentrações de Na^+ no citosol. Isso é feito através de uma regulação na expressão e na atividade dos transportadores de K^+ e Na^+ e nas bombas de H^+ que geram a força motriz para o transporte (Zhu *et al.*, 1993).

Além da compartimentalização do sódio, ocorre também o transporte de íons cloro excedentes no citoplasma para o interior do vacúolo. Essa compartimentalização é mediada por canais ou carreadores de membrana que se acoplam ao Cl^- e movimentam este íon para o interior do vacúolo a favor do gradiente de prótons. Acredita-se que transportadores antiporter Cl^-/H^+ também estejam envolvidos nos processos de compartimentalização deste anion no vacúolo (Hasegawa *et al.*, 2000).

Existem também evidências experimentais de que o Ca^{2+} tem importante função na resposta à salinidade. É sugerido que ele seja responsável pela redução do efeito tóxico do NaCl, presumivelmente por facilitar a seletividade K^+/Na^+ (Liu e Zhu, 1997). O estresse salino também resulta em um acréscimo de Ca^{2+} citosólico, que é transportado do apoplasto e de compartimentos intracelulares (Knight *et al.*, 1997). Acredita-se que SOS3, uma proteína ligadora de Ca^+ , interage fisicamente com a proteína quinase SOS2, ativando a fosforilação dependente da concentração de Ca^+ (Halfter *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). SOS3 também é responsável por recrutar SOS2 para a membrana plasmática e, quando o complexo proteína quinase SOS3-SOS2 é fosforilado, a proteína SOS1 estimula a atividade Na^+/H^+ antiporter (Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002). Indivíduos contendo mutações para a função SOS3, SOS2 ou SOS1 possuem hipersensibilidade ao Na^+ (Zhu *et al.*, 1998).

Nesse contexto, é possível considerar que o acúmulo seletivo e a exclusão de íons possibilitam um ajuste osmótico, resultando em um aumento na retenção da água e na exclusão de sódio (Parida e Das, 2005).

2.3. O estresse oxidativo como uma resposta secundária à salinidade

Uma das alterações bioquímicas que ocorrem quando as plantas são sujeitas ao estresse salino é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) (Meloni *et al.*, 2003). 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 singleto, 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).

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 H₂O₂ e alterações no estado redox indicariam para uma possível mudança do ambiente (Foyer e Noctor, 2003).

As plantas possuem uma série de mecanismos que atuam na proteção contra os danos mediados pelas ROS. 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). Enzimas antioxidantes, como a ascorbato peroxidase (APX), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), estão envolvidas nos principais mecanismos de retirada de ROS do meio intracelular (Mittler, 2002).

A superóxido dismutase é o principal dissipador de superóxidos (O₂⁻) e sua ação enzimática resulta na formação de H₂O₂ e O₂. O peróxido de hidrogênio produzido é então retirado pela ação da catalase e uma variedade de peroxidases (Foyer e Noctor, 1998).

A peroxidação de lipídeos insaturados presentes em membranas biológicas é o sintoma mais proeminente da ocorrência de estresses oxidativos em plantas (Yamamoto *et al.*, 2001). 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 (Blum, 1981) e, em alguns casos, uma alta estabilidade da membrana pode ser correlacionada à tolerância a estresses abióticos (Premachandra *et al.*, 1992).

2.4. Fotossíntese

A fotossíntese é um processo pelo qual plantas, algas e bactérias fotossintetizantes convertem a energia solar em uma forma quimicamente estável de energia, para sintetizar compostos orgânicos. Essa transdução energética é complexa, envolvendo diversos mecanismos físicos e químicos (Strasser *et al.*, 1999).

O processo fotossintético ocorre no cloroplasto. Essa organela, em plantas superiores, possui entre 3 e 10 μm de diâmetro com comprimento de 1 a 4 μm . A dupla membrana do cloroplasto, interna e externa, separa o sistema fotossintético do citoplasma. A membrana externa é altamente permeável a pequenas moléculas, enquanto a membrana interna possui proteínas transportadoras para transferência seletiva de certos metabólitos (Steffen, 2003). No interior do cloroplasto localiza-se um sistema de membranas altamente organizado, denominado membranas tilacoidais ou tilacóide, cercados por uma matriz aquosa, o estroma.

A membrana tilacoidal possui um sistema altamente complexo de proteínas inseridas na bicamada lipídica, incluindo também um espaço aquoso denominado lúmen. Os lipídeos correspondem aproximadamente a 50 % da massa total do tilacóide, sendo os outros 50 % correspondentes aos principais complexos protéicos: fotossistema I e II (PSI e PSII), citocromo b_6f (Cyt b_6f) e ATP sintase (ATPase) (Figura 2) (Steffen, 2003).

Um elemento chave na conversão da energia fotossintética é o transporte de elétrons dentro e entre os complexos protéicos. As reações de transferência de

elétrons são rápidas (picosegundos) e altamente específicas (Jajoo *et al.*, 2001). O processo é iniciado quando a luz é absorvida por complexos pigmento-proteína (PSI, PSII, Cytb6f e ATPase), que estão envolvidos na separação de cargas, transferência de elétrons e síntese de ATP (Steffen, 2003).

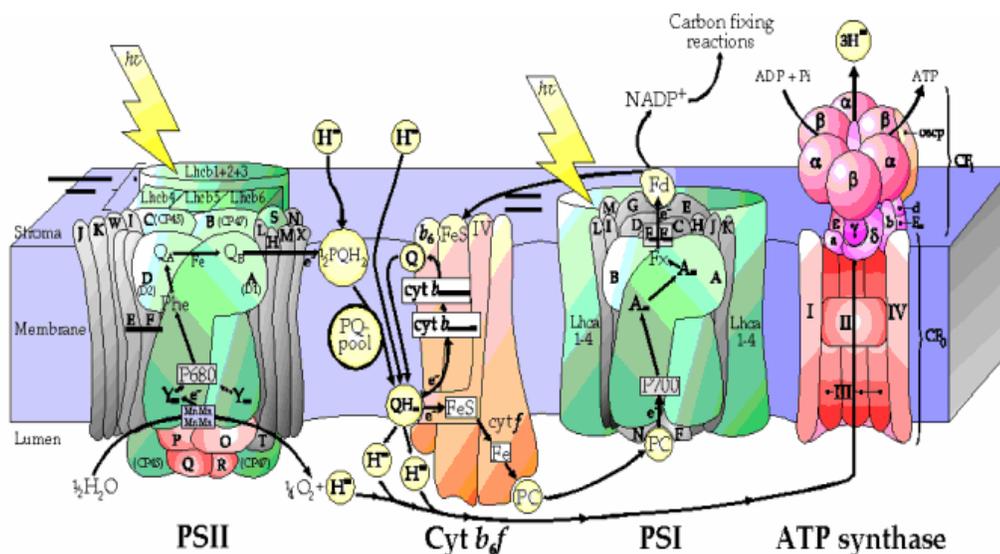


Figura 2 - O Fluxo de elétrons durante a fotossíntese na membrana tilacoidal. (Barber *et al.*, 1997 - *Physiology Plantarum*).

A energia luminosa absorvida pelos complexos coletores de luz (LHC) é transferida para os centros de reação do PSI e PSII onde são usados para iniciar a separação primária de cargas. No caso do PSI, o seu pigmento fotoativo é um par especial de moléculas de clorofila *a* e, baseado em sua propriedade de absorção, ele é geralmente simbolizado por P700. Em relação ao PSII, tais informações não se encontram completamente esclarecidas. Recentes cálculos quânticos (Renger e Marcus, 2002) sugeriram que o P680, o pigmento fotoativo do PSII, consiste de quatro moléculas de clorofila *a* especial e duas moléculas de feofitina acopladas. Além disso, outros modelos são discutidos, questionando o acoplamento de uma ou ambas feofitinas (Jankowiak *et al.*, 2002; Vacha *et al.*, 2002).

A fotossíntese é tradicionalmente dividida em duas fases: fase fotoquímica, que consiste na reação de transferência de elétrons, e a fase bioquímica, que consiste na biossíntese de sacarídeos pela fixação de CO₂. Essas reações ocorrem numa enorme escala e são responsáveis pela produção do oxigênio

atmosférico e, indiretamente, por quase toda biomassa da biosfera (Hankamer e Barber, 1997). A cada ano, mais de 100 bilhões de toneladas de açúcar são produzidos pelos organismos fotossintetizantes em escala mundial (Raven *et al.*, 2001).

2.5. Os pigmentos fotossintéticos

Outro princípio básico compartilhado por todos os organismos fotossintetizantes é o uso de clorofilas e carotenóides como pigmentos coletores de luz. Esses pigmentos orgânicos são capazes de absorver a energia luminosa que iniciará às reações fotoquímicas da fotossíntese. Um possível método de extração desses pigmentos das folhas é a utilização de solventes orgânicos (Steffen, 2003).

Considerando que as clorofilas são os principais pigmentos coletores de luz, os carotenóides são, então, chamados de pigmentos acessórios, possuindo também um papel fundamental na proteção dos complexos pigmento-proteína contra excessos de luz e espécies reativas de oxigênio.

2.5.1. Clorofilas

Biossinteticamente, as clorofilas derivam-se de uma porfirina e consistem de um anel tetrapirrólico contendo um átomo central de Mg^{2+} . A diferença entre clorofila *a* e *b* reside no fato de que a primeira possui um radical metil e a segunda possui um radical aldeído.

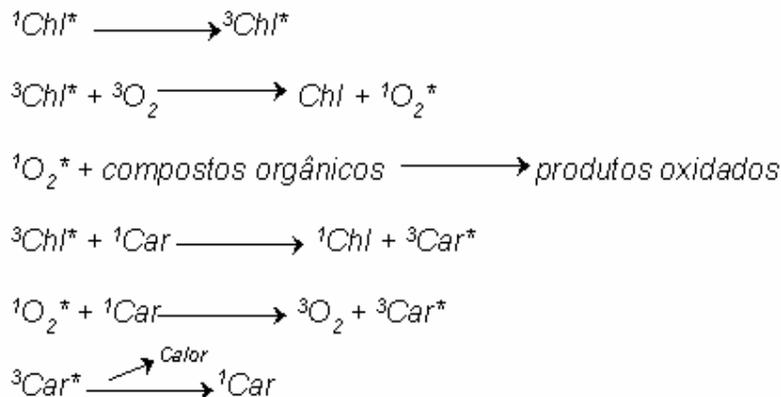
Os diferentes organismos fotossintéticos usam diferentes formas de clorofila no sistema coletor de luz. Algas verdes e vegetais superiores usualmente possuem clorofilas *a* e *b*, enquanto a clorofila *c* é encontrada em algas marrons e diatomáceas, e a clorofila *d* em algumas cianobactérias (Steffen, 2003).

O peso da produção anual de clorofilas e carotenóides, que são os mais abundantes pigmentos biológicos do planeta, excede a 10^9 toneladas (Hendry *et al.*, 1987). Os eventos associados à degradação de pigmentos são numerosos e têm sido bastante estudados (Hendry *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1991).

2.5.2. Carotenóides

A denominação carotenóide é um termo genérico para classificar uma classe de carotenos e seus derivados oxigenados, as xantofilas. Aproximadamente 150 dos 600 carotenóides conhecidos são encontrados em organismos fotossintetizantes. Os carotenóides consistem de uma cadeia de oito unidades isoprênicas conjugadas e geralmente são distintos por seu grupo final. Entretanto, derivados foram encontrados onde o esqueleto de carbono foi encurtado pela remoção de fragmentos. Esses derivados são denominados apo-, diapo- ou norcarotenóides. Já em relação a plantas superiores e algas verdes, os pigmentos encontrados são β -, ϵ - e ψ - carotenos (Steffen, 2003).

A energia absorvida pelos carotenóides é eficientemente transferida para as clorofilas por transferência de energia de excitação singleto. A principal função dos carotenóides, entretanto, é a proteção contra fotodestruição. Este efeito deletério é originado a partir da geração de clorofilas no estado tripleto. A clorofila em estado tripleto reage com moléculas de oxigênio tornando-as altamente reativas (singleto). Os carotenóides previnem essas reações destrutivas pela desativação da clorofila tripleto, bem como do oxigênio singleto. As reações envolvendo a fotodestruição e a proteção do sistema podem ser resumidas no esquema a seguir:



2.6. O Fotossistema II

estroma (Bricker, 1990; Sayre e Wrobelboerner, 1994). De Vitry e colaboradores (1984) mostraram que estão associadas aproximadamente 20 clorofilas *a* e quatro ou cinco moléculas de β -caroteno por cadeia polipeptídica. Foi também demonstrado que essas proteínas contêm pequenas quantidades de luteína (Bassi *et al.*, 1993).

2.7. O genoma e proteoma cloroplastídico

O cloroplasto é uma organela semi-autônoma, possuindo uma completa maquinaria para expressar sua informação genética. Seu genoma circular apresenta tamanho entre 120 e 160 Kb, que codifica aproximadamente 120 proteínas e moléculas de RNA, estando estas envolvidas na transcrição e tradução das subunidades componentes dos quatro complexos protéicos envolvidos na fotossíntese (Sugita e Sugiura, 1996). Os complexos PSI, PSII, Cytb₆f e ATP sintase apresentam entre 75 e 100 proteínas. Juntas, elas são responsáveis pelas reações fotossintéticas (Ort e Yocum, 1996).

Estima-se que o cloroplasto contenha entre 2000 e 5000 proteínas diferentes, sendo que a maioria delas é codificada pelo genoma nuclear (Peltier *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, a sequência de diversos plastomas revelou que as proteínas localizadas no centro de reação de cada fotossistema são codificadas pelo próprio genoma cloroplastídico, enquanto que as proteínas periféricas são provenientes do genoma nuclear (Pfannschmidt, 2003). Essa dupla localização dos genes fotossintéticos dificulta a expressão, causando um imenso custo para a regulação celular.

Embora o nível da maioria dos transcritos nucleares destinados ao cloroplasto possa mudar drasticamente durante seu desenvolvimento, a expressão dos genes cloroplastídicos permanece constante. Isso indica que os mecanismos pós-transcricionais e traducionais têm um papel importante na expressão diferencial dos genes cloroplastídicos (Yang *et al.*, 1997).

Postula-se que o tilacóide contenha um grande número de proteínas que estão envolvidas na biogênese, manutenção e regulação dos quatro multi-complexos (Wollman *et al.*, 1999). Esses processos são bastante complexos e requerem expressão coordenada de genes nucleares e cloroplastídicos,

coordenação entre o acúmulo e degradação de proteínas, biossíntese de alguns cofatores e a formação e manutenção da bicamada lipídica.

Com relação à estrutura protéica do PSII, esse dímero macromolecular consiste das proteínas D1/D2/CP43/CP47 e diversas proteínas coletoras de luz. Nesse caso, as quatro proteínas citadas são produtos gênicos do próprio plastoma. Cabe ressaltar, que sendo o genoma cloroplastídico um DNA circular, algumas de suas características são similares a genomas bacterianos. Como exemplo pode-se citar a presença de operons, como é o caso dos genes *psbC* e *psbD*, responsáveis por codificar as proteínas CP43 e D2, respectivamente.

Nos últimos anos, um grande número de pesquisas foi realizado visando a identificação e a caracterização de proteínas envolvidas nesses processos. Como exemplo, foram identificadas as proteases DegP e FtsH, entre outras (Adam, 1996; Chen *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2002), proteínas translocadoras de cofatores metálicos (Burkhead *et al.*, 2003; Shikanai *et al.*, 2003), fatores específicos de montagem do PSII, como Hcf136 (Meurer *et al.*, 1998), proteínas envolvidas na maturação de RNA (Monde *et al.*, 2000), e uma isomerase luminal TLP40 (Fulgosi *et al.*, 1998).

Dessa forma, para regular a biogênese e outras funções tilacoidais, quinases (Snyders e Kohorn, 1999), fosfatases (Vener *et al.*, 1998) e possivelmente outros transdutores de sinais estão presentes na membrana tilacoidal. Outras proteínas com função não caracterizada também têm sido identificadas no espaço intra-tilacoidal (Kieselbach *et al.*, 1998) e, baseado nessas informações, acredita-se que aproximadamente 100 proteínas estejam envolvidas nos processos descritos acima, sendo expressas em níveis menores que os componentes do aparelho fotossintético (Peltier *et al.*, 2000), tornando sua identificação bioquímica bastante complexa (Snyders e Kohorn, 1999; Depege *et al.*, 2003).

2.8. Resposta da maquinaria fotossintética a estresses ambientais

Sendo a fotossíntese um processo físico-químico dependente de luz, ela também pode ser influenciada pelas condições do meio em que a planta se encontra (Devlin, 1976). Portanto, diferentes estresses ambientais podem afetar a eficiência fotossintética de uma planta, prejudicando a taxa de reações químicas

inerentes ao processo ou a organização estrutural dos componentes envolvidos. Neste sentido, a configuração dos complexos protéicos ao longo da membrana tilacoidal representa papel fundamental (Opanasenko *et al.*, 1999) pois, ao atuarem sobre o sistema, os estresses ambientais podem danificá-los, prejudicando seu funcionamento.

Diversos estresses exercem sobre o organismo um aumento no custo da manutenção, refletindo em sua respiração. Alta temperatura, luz excessiva, drogas, doenças e a própria salinidade mostraram um aumento na respiração com redução da fotossíntese (Takemura *et al.*, 2000).

A provável seqüência de eventos fisiológicos e bioquímicos pode mudar com o aumento da salinidade, alterando o nível de gás carbônico intracelular e a abertura de estômatos (Takemura *et al.*, 2000). Pelo aumento de CO₂, foi demonstrado que a salinidade interfere diretamente na fotossíntese, provavelmente pela inibição parcial da atividade da Rubisco, enzima primordial da fase bioquímica de fixação do carbono (Nazaenko, 1992). A Rubisco existe como uma holoenzima composta de oito subunidades maiores (LSUs; 55 kD), codificadas pelo gene cloroplastídico *rbcL* e oito subunidades menores (SSUs; 15 kD), codificadas no núcleo pela família gênica *rbcS* (Spreitzer, 1993).

A sensibilidade da holoenzima Rubisco ao estresse oxidativo também é bastante elucidada (Cohen, 2005). Shapira *et al.* (1997) demonstraram que a oxidação é seguida de clivagem proteolítica de polipeptídeos da subunidade LSU e, paralelamente, a tradução de *rbcL* cessa, retornando apenas quando condições ótimas são reestabelecidas.

A membrana tilacoidal também pode se adequar a condições de estresse abiótico. Isso requer respostas em curto prazo, como transição de estado e aumento nos componentes de dissipação de energia e respostas a longo prazo, como mudanças na razão PSI/PSII (Aro e Andersson, 2001).

O estresse salino também resulta num significativo acúmulo de sódio e cloro nas folhas, induzindo uma redução no teor de pigmentos e, portanto, um decréscimo na eficiência fotossintética (Lu *et al.*, 2002). Esse decréscimo poderia, de outro modo, ser uma conseqüência indireta de uma fisiologia prejudicada devido ao estresse.

2.9. A fluorescência da clorofila *a* como monitoramento do desempenho do aparelho fotossintético

A energia do fóton absorvido pelos pigmentos fotossintéticos desencadeia as reações fotoquímicas (Schreiber *et al.*, 1998). O fluxo de fótons excita a molécula de clorofila, levando-a a um primeiro estado excitado, singleto (Holzwarth, 1991), e a separação de cargas no centro de reação ocorre após alguns picosegundos (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1993). Quando não ocorre a separação de cargas, o pigmento excitado retorna a um nível basal e a energia absorvida é emitida como calor (D) e fluorescência (F) (Krause e Weis, 1991).

Com o início da absorção da energia luminosa, os aceptores localizados nos tilacóides estão aptos a receberem elétrons das moléculas de clorofila *a* especial. Como resultado, o número de aceptores aptos a aceitarem os elétrons é rapidamente reduzido a zero, pois todos os sítios de redução estão ocupados em consequência da ativação da fase fotoquímica. Dessa forma, a fluorescência é elevada durante a atividade do aparelho fotossintético, sendo reduzida posteriormente. A cinética de emissão da fluorescência e as fases da curva são convencionalmente denominadas de **OIDPSMT** (Figura 4)

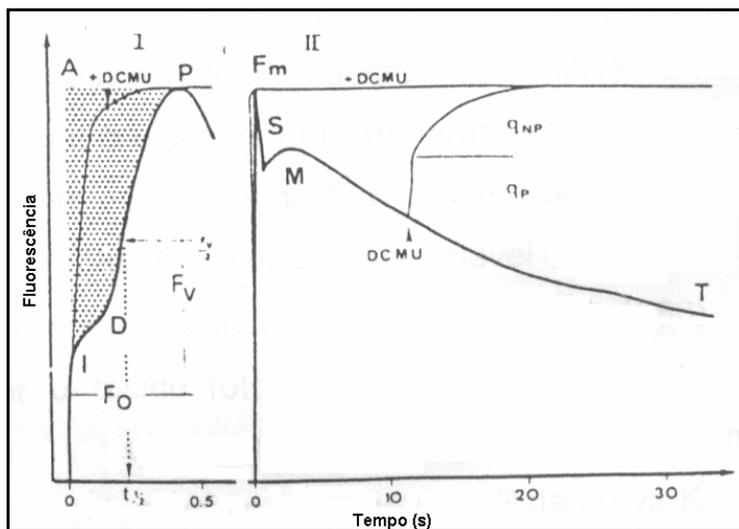


Figura 4 - Cinética da emissão de fluorescência. A indução da fluorescência da clorofila envolve duas transientes: I – Fase transiente rápida (níveis OIDP) e II – Fase não transiente lenta (níveis SMT).

Após mantido o tecido fotossintetizante no escuro (adaptação de 15 a 30 minutos), verifica-se que durante a iluminação há uma elevação inicial da fluorescência denominada de F_0 (fluorescência mínima ou inicial). O valor F_0 representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofila *a* excitadas, antes de a energia ser transferida para o centro de reação do PSII (Mathis e Paillotin, 1981). O valor de F_0 é alterado por estresses ambientais, devido a mudanças estruturais nos pigmentos fotossintéticos do PSII (Adams *et al.*, 1992).

Após iluminar o tecido fotossintetizante com uma luz forte (luz actínica), a fluorescência passa do nível F_0 a um nível intermediário I , atingindo posteriormente o nível D e, após este nível, a fluorescência chega ao nível máximo da curva de Kautsky, o nível P . Acredita-se que a fase OI esteja relacionada ao início da liberação de O_2 (Papageorgiou, 1975), iniciando a saída de Q_A para o “pool” de plastoquinona através de Q_B , no ponto I . Após o decréscimo no nível D , ocorre um aumento da fluorescência até atingir o pico P da curva. Nesse ponto, todos os centros de reação encontram-se fechados. Ainda nessa fase, acredita-se que o processo fotoquímico esteja operando com eficiência máxima. O nível S é caracterizado pela formação do gradiente de H^+ , gerado pelo transporte de elétrons. Esse gradiente produz uma energização do tilacóide, ocasionando uma redução na curva nas fases PS (Bøhler-Nordenkamp *et al.*, 1989). O segundo pico da curva, denominado M , está relacionado com o início da assimilação de CO_2 .

A indução da fluorescência da clorofila envolve uma fase transiente, que é rápida (fase $OIDP$), e uma fase não transiente, lenta (fase SMT). A fluorescência transiente da clorofila é conhecida como fluorescência variável (F_v), representando a fluorescência entre os níveis O (F_0 – fluorescência inicial) e P (F_m – fluorescência máxima) (Krause e Weis, 1991).

A diminuição da fluorescência entre os níveis P e T é denominado quenching (q), que é uma forma de dissipação. Os quenchings são divididos em dois tipos: quenching fotoquímico (qP) e quenching não-fotoquímico (qM). O quenching fotoquímico é a dissipação ocasionada pela utilização da energia absorvida pelo processo fotoquímico. O quenching não-fotoquímico representa a dissipação da energia absorvida por outras formas, principalmente por calor.

Em fluorímetros de luz modulada de modelo Mini-Pam, o processo de dissipação de energia, denominado *quenching*, é expresso matematicamente:

$$qP = (F'_m - F) / (F'_m - F_0)$$

Se considerarmos $qN = 1 - qP$

$$qN = (F_m - F'_m) / (F_m - F_0)$$

Onde o sinal (') está relacionado ao tecido fotossintetizante previamente iluminado.

Como já citado anteriormente, a energia absorvida pode ser utilizada na produção de ATP e NADPH₂, liberado na forma de calor (D) e emitida na forma de fluorescência (F).

Neste sentido, os processos fotoquímicos poderiam ser representados pela equação:

$$Ph + D + F = 1$$

Onde:

Ph - rendimento quântico do fotossistema II

F - fluorescência

D - dissipação na forma de calor

De acordo com Schreiber e colaboradores (1998), o rendimento quântico do fotossistema II (Ph) pode ser representado pela razão F_v/F_m . Em condições normais as plantas apresentam essa razão entre 0,75 e 0,85 (Butler e Kitajima, 1975), verificada em diferentes espécies e entre variedades de uma mesma espécie.

Sendo assim, a razão F_v/F_m é proporcional ao rendimento quântico máximo do PSII, sendo sensível à diversas alterações ambientais que possam afetar a eficiência na absorção de energia (Babani e Lichtenthaler, 1996). Dessa forma, as medições das taxas fotossintéticas tornam-se de fundamental importância no exame de genótipos contrastantes (Passos, 1996).

Atualmente muitos estudos têm sido realizados com o uso de medidas da fluorescência da clorofila *a* associada ao fotossistema II (Newton e McBeath, 1996). Isso foi possível devido ao desenvolvimento de fluorímetros modulados (Ögren e Baker, 1985), que utilizam uma fonte luminosa de excitação modulada (1 a 100 kHz), juntamente com um sistema de detecção de fluorescência.

Esse método tem sido proposto para verificar a tolerância à salinidade em diferentes espécies de importância agrônômica (Smillie e Nott, 1982; Havaux *et al.*, 1988; Mekkaoui *et al.*, 1989; Monneveux *et al.*, 1990). Em alguns casos,

mudanças nas variáveis de fluorescência podem ser observadas, pois a maioria das cultivares tolerantes exibe um reduzido decréscimo na eficiência fotoquímica quando crescem em condições de estresse (Plaut *et al.*, 1990).

2.10. Identificação e análise de genes diferencialmente expressos

Com o advento da biologia molecular e, posteriormente, da era genômica, a identificação e caracterização de genes tornou-se um método alternativo mais fácil e bastante informativo (Gygi *et al.*, 2000). Vários métodos, incluindo análise serial da expressão gênica, oligonucleotídeos, cDNA microarray e macroarray e sequenciamento em larga escala de “expressed sequence tags” têm sido desenvolvidos para medir quantitativamente a população de mRNAs transcrita em um determinado organismo, (White *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003). Esses programas, visando à caracterização transcriptômica de algumas espécies, são denominados projetos EST (*Expressed Sequence Tag* ou Etiqueta de Seqüências Expressas). Enfim, tais programas são uma poderosa ferramenta para identificar genes expressos em determinados tecidos e em diferentes condições.

Apesar de ter sido realizado o mapeamento genético da cana-de-açúcar (Al Jabani *et al.*, 1993; da Silva *et al.*, 1993; Ming *et al.*, 2002; Mudge *et al.*, 1996; D’Hont *et al.*, 1994; Hoarau *et al.*, 2001), o cruzamento visando à obtenção de variedades mais produtivas, resistentes a pragas e doenças e adaptadas a condições edafoclimáticas adversas, é um processo demorado e difícil. O tempo de obtenção dessas novas cultivares pode levar entre 10 a 15 anos. Além disso, a complexidade do genoma da cana-de-açúcar dificulta a aplicação de técnicas clássicas de melhoramento genético (D’Hont *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 1999). Assim, a cana torna-se uma forte candidata ao melhoramento por meio da engenharia genética. A identificação de genes responsáveis por qualidades agronomicamente importantes e desejáveis e sua posterior manipulação por meio de técnicas de biologia molecular podem possibilitar a obtenção de variedades adaptadas a diferentes condições, reduzindo drasticamente a perda da produção, além de permitir o aproveitamento de solos não agricultáveis.

2.11. Regulação dos genes fotossintéticos em resposta a estresses ambientais

Como descrito anteriormente, o cloroplasto possui uma variedade de complexos macromoleculares, que são compostos por proteínas codificadas pelos genomas nuclear e cloroplastídico. Esses genes fotossintéticos têm sua expressão altamente coordenada (Pfannschmidt, 2003). Em células eucarióticas, a fase inicial dos estresses ambientais afeta o potencial redox do cloroplasto (Allen, 1993). No PSII, particularmente uma das proteínas componentes do centro de reação, a proteína D1, é um elemento chave dinâmico no transporte de elétrons, bem como no processo de aclimatação (Aro *et al.*, 2000).

Um dos principais estresses descritos na literatura é o estresse luminoso. Ele é responsável por estimular fortemente a transcrição de mRNA correspondentes ao processo fotossintético em plantas e algas (Trebitsh *et al.*, 2000; Baena-Gonzalez *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que os genes *lhcb* (Kaufman, 1993), *rbcS* (Fluhr e Chua, 1986), *psbA* (Pfannschmidt, 2003), *psbD-psbC* e o *petG* (Yang *et al.*, 1997) tem seus promotores fortemente regulados pela luz.

Embora diversos trabalhos tenham demonstrado a transcrição dos genes *psbA*, *psbD-psbC* e de outros genes nucleares em resposta à fotoinibição (El Bissati e Kirilovsky, 2002; Trebitsh *et al.*, 2000; Pfannschmidt *et al.*, 1999; Durnford e Falkowski, 1997), pouco é conhecido acerca dos níveis de transcrição de genes cloroplastídicos em resposta a outros estresses ambientais, particularmente à salinidade.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Sendo a cana-de-açúcar susceptível à salinidade e tendo em vista que pouco é sabido a respeito do efeito do estresse salino sobre essas plantas, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito do estresse salino sobre a eficiência fotoquímica em duas variedades de cana-de-açúcar, bem como estudar a regulação da expressão de genes cloroplastídicos de proteínas do PSII.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Estudar o efeito do estresse salino sobre a eficiência fotoquímica entre as variedades RB72454 e CB4789.
- b) Analisar o efeito da salinidade sobre o teor de clorofila e sobre os níveis de peroxidação de lipídeos.
- c) Amplificar os genes cloroplastídicos envolvidos no processo fotoquímico.
- d) Analisar o perfil de expressão dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Durante os trabalhos foram utilizadas as cultivares de cana-de-açúcar RB72454 e CB4789. Mudanças micropropagadas dos diferentes materiais foram obtidas do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFRRJ (Campus Leonel Miranda - Campos dos Goytacazes-RJ). Estas plantas foram crescidas em bandejas vazadas, de isopor, contendo 160 células com aproximadamente 10 cm³ de substrato.

Posteriormente, as plantas apresentando 60 dias de idade foram cultivadas em canteiros por mais 60 dias e, em seguida, transferidas do solo para cultivo hidropônico em solução nutritiva Yoshida (Yoshida, 1987) sob aeração, sendo mantidas por 24 horas para possíveis adaptações a hidroponia.

Durante os trabalhos de estresse as plantas foram mantidas em câmara climática (Figura 5) (Fitotron - HERAEUS-VOTSCH, Alemanha) com umidade relativa (UR) de 80 %, fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 28 °C com fluxo de fótons fotossintéticos de ~400 μmol m⁻² s⁻¹.



Figura 5 - Cultivares de cana-de-açúcar monitoradas em câmara climática sob condições controladas: fotoperíodo de 16 horas, 28 °C, 80% UR e fluxo de fótons de $\sim 400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas foram mantidas em bandejas com solução hidropônica sob aeração, contendo ou não o agente estressante (1 % NaCl e 1,7 % NaCl – bandejas 2 e 3, respectivamente).

4.2. Indução do estresse

As plantas foram submetidas aos estresses salino a 1 % NaCl (1 g de NaCl em 100 mL de solução nutritiva) e 1,7 % NaCl, resultando em um potencial osmótico (Ψ_s) de -0,5 MPa e -1,2 MPa, respectivamente, medidos com um osmômetro.

Os tratamentos aplicados sobre as plantas a serem utilizadas nos ensaios de Northern blotting consistiram na exposição das plantas aos estresses: 0,5 % NaCl, 1 % NaCl, 1,7 % NaCl, 1 % KCl, 15 % PEG 8000, 6 °C, 44 °C e ferimento (utilizando-se de pinças). As plantas foram submetidas a esses estresses durante 24 horas. Após os períodos de exposição, as folhas foram imediatamente congeladas em N_2 líquido, sendo mantidas em freezer -70 °C.

4.3. Análise da eficiência fotoquímica do PSII

A análise da eficiência fotoquímica foi feita por meio de um fluorímetro de luz modulada modelo MINI-PAM (Walz, Germany), utilizando-se de seis repetições. As medições foram efetuadas após 30 minutos de adaptação ao

escuro, utilizando-se pinças DLC-8, apropriadas ao sensor do MINI-PAM. As leituras foram feitas na região mediana da primeira folha completamente expandida, abaixo do cartucho foliar.



Figura 6 - Monitoramento da eficiência fotoquímica do fotossistema II pela medição das variáveis de fluorescência da clorofila *a*. Pinças DLC-8, apropriadas ao sensor do MINI-PAM, foram colocadas na região mediana da primeira folha completamente expandida, abaixo do cartucho foliar (A), e mantidas durante 30 minutos para que a região, onde seriam efetuadas as medições das variáveis de fluorescência, se adaptasse ao escuro. Após os 30 minutos, o sensor foi encaixado na pinça (B), sendo que esta foi posteriormente aberta, possibilitando dessa forma a incidência da luz modulada sobre a região foliar a ser analisada.

O monitoramento do desempenho do fotossistema II pela medida das variáveis de fluorescência foram realizadas a partir do início do estresse (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. A fluorescência inicial (F_0) foi obtida com luz modulada de baixa intensidade ($< 0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a fluorescência máxima (F_m) foi determinada com um pulso de luz saturante de 0,8 s ($3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Adicionalmente, foram obtidos dados referentes ao qP (*Quenching* fotoquímico) e qN (*Quenching* não fotoquímico).

4.4. Medições da intensidade de coloração verde (clorofila)

Paralelamente às leituras de fluorescência, utilizando-se dos mesmos intervalos de tempo e na mesma posição de leitura do MINI-PAM, foram também realizadas medições da intensidade de coloração verde (clorofila), pela utilização do clorofilômetro SPAD-502 – Soil Pant Analyser Development (Minolta). O medidor de clorofila, SPAD-502, usa diodos que emitem luz na faixa de 650 a 940

nm através da folha. O comprimento de onda de 650 nm situa-se próximo ao dois comprimentos primários de onda associadas com a atividade da clorofila (645 e 663 nm). O comprimento de onda de 940 nm serve como referência interna para compensar diferenças na espessura da folha e no teor de água. O clorofilômetro mede a diferença de atenuação da luz entre 650 e 940 nm como um índice de intensidade de cor ou de concentração de clorofila (Yadava, 1986).

4.5. Peroxidação de lipídeos

A peroxidação lipídica foi determinada, indiretamente, pelo conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, subprodutos da peroxidação lipídica), baseado na metodologia proposta por Dhindsa e Matowe (1981), porém com algumas modificações. 500 mg de amostra vegetal foram maceradas em nitrogênio líquido. O macerado foi então homogeneizado em 5 mL de 0,1 % de ácido tricloroacético (TCA) com 0,01 % de polivinil poli pirrolidona (PVPP). O homogenato foi centrifugado a 10000 g por 5 minutos. Para cada alíquota de 1 mL do sobrenadante foram adicionados 4 mL da solução de 20 % de TCA contendo 0,5 % de TBA. A mistura foi aquecida a 95 °C por 30 min e então resfriada rapidamente em gelo. Após centrifugação de 10000 g por 10 minutos, a absorvância do sobrenadante foi lida a 535 nm e o seu valor subtraído do valor da absorvância inespecífica a 600 nm. A concentração de TBARS foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.6. Extração de DNA genômico

Folhas de cana-de-açúcar (cv. RB72454) e arroz (cv. TN-1) foram macerados em nitrogênio líquido utilizando almofariz de porcelana até atingirem a consistência de pó fino. Em seguida, 100 mg do macerado foi transferido para um tubo de microcentrífuga e acrescido de 300 μL do reagente Plant DNAzol (Gibco BRL). O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e após 5 minutos sob agitação, 300 μL de clorofórmio (Merck) foi adicionado e incubado por mais 5 minutos.

O material foi centrifugado durante 10 minutos a 10000 g e sua fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo, sendo posteriormente acrescido de 225 μL de etanol e incubado por 5 minutos.

Após incubação, o material foi centrifugado durante 4 minutos a 5000 g e o sobrenadante foi posteriormente descartado. Ao precipitado foi adicionado 300 µL da seguinte solução – 1 DNAzol : 0,75 etanol. Este foi colocado em vortex e incubado por 5 minutos. A mistura foi novamente centrifugada durante 4 minutos a 5000 g e o sobrenadante foi descartado.

O tubo foi mantido invertido durante 5 minutos para eliminação do etanol e, posteriormente, o precipitado foi seco ao ar. O DNA precipitado foi ressuspenso em 70 µL de TE RNase e armazenado em freezer –20 °C.

4.7. Seleção dos genes cloroplastídicos a serem amplificados e desenho dos iniciadores correspondentes

Foram selecionados os genes cloroplastídicos envolvidos no processo de absorção e transferência de energia na membrana tilacoidal. Dessa forma, os iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos via PCR foram desenhados a partir da análise do genoma do cloroplasto de arroz, já previamente sequenciado e atualmente depositado no banco internacional de seqüências (“GeneBank”). Os genes selecionados e a seqüência de seus iniciadores são descritos abaixo.

<u>GENES</u>	<u>PB</u>	<u>PTN</u>	<u>OLIGONUCLEOTÍDEOS</u>
<i>psaA</i>	2255	PSI-A (TM)	5'- ATGATGATTTCGTTCCGCCGGA
			5' -CTATCCTACTGCAATAATTCTCGCT
<i>psaB</i>	2200	PSI-B (TM)	5' -ATGGAATTAAGATTTCCCA
			5' -TTAACCAAACCTGCCTGAT
<i>psaC</i>	250	PSI-C (S)	5' -ATGTCACATTCCGTAAAAAT
			5' -TCAATAAGATAGAGCCATGCT
<i>psbA</i>	1067	D1 V	5' -ATGACTGCAATTTTAGAGAGA
			5' -TTATCCATTAAGAGATGGAACT
<i>psbB</i>	1530	CP47 (TM)	5'- ATGGGTTTGCCCTGGTAT
			5' -TCAGACTGGCTGTCTCCCTGT
<i>psbC</i>	1420	CP43 (TM)	5'-ATGAAAATCTTATATTCCTGA
			5'-TTAGTTAAGAGGGGTCATGTAA
<i>psbD</i>	1060	D2 (TM)	5'-ATGACTATAGCCCTTGGTA
			5' -TTAAAGAGCGTTTCCACGT

<i>PsbE</i>	255	α -Cyt <i>b559</i> (TM)	5'-ATGTCTGGAAGCACGGGA
			5'-CTAAAAGGATCTACTAAATTCATC
<i>psbF</i>	120	β -Cyt <i>b559</i> (TM)	5'- ATGACCATAGATCGAACCTAT
			5'-TTATCGTTGGATGAACTGCA
<i>psbG</i>	750	PSII-G	5'-ATGGTCTTAACTGAATATTCAGAC
			5'-CTAATTCACTAATTTGTAGGAAGA
<i>psbH</i>	250	PSII-H (TM)	5'-ATGGCTACACAAACCGTTGA
			5'-CTAATTCATTAATAATTCGGTCCA
<i>psbI</i>	113	PSII-I (TM)	5'-ATGCTTACTCTCAAACCTTTTTGT
			5'- TTAATCGTCACGCCCA
<i>psbK</i>	200	PSII-K (TM)	5'-ATGCCTAATACTTAGTTTAACCT
			5'-TCATCGAAAACCTTACAGCA
<i>psbL</i>	120	PSII-L (TM)	5'-ATGACACAATCAAACCCGA
			5'-TCAATTGAAGAAGTAATTGGA
<i>psbM</i>	115	PSII-M (TM)	5'-ATGGAAGTCAATATTCTCGCA
			5'-TTAATCATTTTGGCTGACTGT
<i>psbN</i>	134	PSII-N (TM)	5' -ATGGAACAGCAACTTTAGT
			5' -TTAGTCCCCGTGTTCTTCGA
<i>petA</i>	970	Citocromo <i>f</i> (TM)	5'-ATGGAAAATAGAAATACTTTTTCTT
			5'-CTAGAAATTCATTTCGTACAATT
<i>petB</i>	650	Citocromo <i>b₆</i> (TM)	5'-ATGAGTAAAGTATATGATTGTTTTGAGGA
			5'-TTATAAAGGGCCCGAAAT
<i>petD</i>	500	Subunidade IV (TM)	5'-ATGGGAGTACAAAGAAACCTGACTTAAACG
			5'-CTAAAAAAGACCTAAAGTTAAGGA
<i>petE</i>	130	-	5'-ATGATTGAAGTTTTTCTATTTGGA
			5'-TCAAAGATCCAACCTGATCCCCA
<i>atpA</i>	1500	CF ₁ α (S)	5'-ATGGCAACCCTTCGAGT
			5'-TTATGTTTGTTCCTGAAGGGAA
<i>atpB</i>	1500	CF ₁ β (S)	5'-ATGAGAACCAATCCTACTACTT
			5'-TCATTTCTTCAATTTGTTCTC
<i>atpE</i>	415	CF ₁ ϵ (S)	5'-ATGAAATTAATCTTTATGTAAGTGA
			5'-TCAATTAGATGGGGGAAT
<i>atpF</i>	1300	CF ₀ I (TM)	5'-ATGAAAAATGTAACCCATTCTT
			5'-TCATTCCATGGCCCCGAGAA
<i>atpH</i>	250	CF ₀ III (TM)	5'-ATGAATCCACTAATTGCTGCT
			5' -TTAAACAAAAGGGTTTCGCAA
<i>atpI</i>	750	CF ₀ IV (TM)	5'-ATGAATATTATACCGTGTTCOA
			5'-TCAATGATGACCCTCCAT

(TM) – Proteína Transmembrana

(S) – Proteína Stromal

4.8. Amplificação dos genes cloroplastídicos via reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para os procedimentos de uma reação de 50 μ L foram utilizados 40 a 50 ng de DNA genômico, 0,4 mM dos iniciadores (Imprint do Brasil) apropriados, 2 unidades da enzima TAQ DNA polimerase e tampão de enzima 1X concentrado contendo 1,5 mM de $MgCl_2$. A mistura de nucleotídeos (dNTP – Pharmacia) foi adicionada para uma concentração final de 0,2 mM de cada nucleotídeo.

As reações se procederam durante 40 ciclos da seguinte forma:

- Temperatura de Desnaturação – 95 °C \Rightarrow 1 minuto.
- Temperatura de Anelamento dos Iniciadores – 42 °C \Rightarrow 45 segundos.
- Temperatura de Extensão – 72 °C \Rightarrow 2 minutos.
- Temperatura Final – 72 °C \Rightarrow 10 minutos.

4.9. Extração de RNA total

Todo material (vidraria e metais) utilizado para extração de RNA total foi submetido a tratamento sob alta temperatura (180 °C) durante 4 horas. Os materiais plásticos foram lavados com Dietil pirocarbonato (DEPC) e soluções e géis foram feitos com água-DEPC para a eliminação de RNase. Todos os procedimentos foram conduzidos em baixa temperatura (banho de gelo).

Foram macerados 100 mg de tecido foliar fresco com auxílio de almofariz e pistilo, na presença de N_2 líquido. O macerado foi transferido para tubos de microcentrifuga (1,5 mL) novos e livres de RNase. A esse material foi adicionado 1 mL do reagente TRIZOL (Life Technologies). O conteúdo do tubo foi vigorosamente misturado por inversão, até que houvesse a mistura completa das fases, e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 8 °C) e o sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo. A amostra foi então acrescida de 100 μ L de clorofórmio, agitando vigorosamente a mistura por 15 segundos. Incubou-se por 3 min à temperatura ambiente e fez-se outra centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 8 °C, transferindo o sobrenadante para outro tubo novo de 1,5 mL, ao qual adicionou-se 250 μ L de isopropanol e 250 μ L de solução salina (citrato

trissódico 0,8 M e NaCl 1,5 M). O material foi misturado suavemente por inversão e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugou-se a mistura a 12000 g, 10 min e 8 °C, descartando-se, em seguida, o sobrenadante e adicionando-se sobre o sedimento resultante 1 mL de etanol 75% com agitação suave. A amostra foi novamente centrifugada, 7500 g por 5 minutos e 8 °C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi seco a 37 °C por aproximadamente 10 minutos, sendo posteriormente ressuspenso com 50 µL de água-DEPC.

Uma alíquota (1 µL) de cada amostra de RNA total foi submetida à eletroforese em gel de agarose-DEPC 0,8% para quantificação, fotodocumentação e confirmação da qualidade. O material restante foi armazenado em freezer -20 °C até o momento do uso.

4.10. Northern blotting

4.10.1. Transferência das amostras de RNA total para membrana de nylon

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,2 % desnaturante, contendo MOPS, H₂O, agarose e formaldeído. Foram utilizadas 10 µg de RNA total, ao qual foram acrescentados tampão de amostra desnaturante (formamida deionizada, formaldeído e MOPS). As amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 minutos e resfriadas imediatamente em banho de gelo, sendo mantidas nessa condição até a aplicação no gel. As amostras, em banho de gelo, foram misturadas com tampão de carregamento (glicerol, EDTA e azul de bromofenol) e aplicadas no gel desnaturante sob voltagem constante de 4-5V cm⁻¹, até que o corante (azul de bromofenol) atingisse 75 % da extensão do gel (~7cm). Em seguida, o gel foi lavado em excesso de água por 15 minutos e posteriormente transferido para solução de SSC 10X, mantido sob agitação suave. O processo de embebição em SSC 10X foi feito 2 vezes durante 5 minutos sob suave agitação.

A transferência para membrana foi feita por capilaridade, utilizando-se papel toalha absorvente e, como tampão de transferência, utilizou-se SSC 10X. O procedimento ocorreu durante doze horas e ao término lavou-se a membrana com SSC 10X suavemente para remover resíduos do gel. A membrana contendo as

moléculas de RNA foi envolta em papel de filtro e incubada a 80 °C por 2 horas para fixação do RNA na membrana.

4.10.2. Marcação da sonda

Para a purificação do DNA amplificado a ser utilizado como sonda utilizou-se o kit Wizard SV (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Após a purificação os fragmentos foram marcados com P³²- α -dCTP (50 μ Ci) pela utilização de Ramdon primers.

Foram utilizados 70 ng de DNA em um volume final de 20 μ L de água ultra pura. A amostra foi então desnaturada por fervura durante 5 minutos e posteriormente resfriada imediatamente em gelo por mais 5 minutos. Ao DNA desnaturado foram adicionados 5 unidades da enzima Klenow DNA polimerase I (USB), tampão da enzima 1X concentrado, 50 μ M de dATGTP (adenina, timina e guanina) (Amersham Pharmacia), 5 μ L de Random primer (GibcoBRL), 30 μ Ci de P³²- α -dCTP e água ultra pura, para um volume final de 50 μ L. A reação de 50 μ L foi misturada e incubada a 37 °C por 1 hora.

Após a marcação a sonda foi purificada em coluna sephadex G25, para que nucleotídeos não incorporados fossem removidos. A amostra foi então desnaturada por fervura durante 10 minutos e imediatamente após a desnaturação, a sonda foi mantida em gelo até o momento de hibridização.

4.10.3. Hibridação e exposição da membrana em filme de raio X

As membranas foram pré-hibridadas a 42 °C durante 4 horas. Foram utilizados cilindros de hibridação calculando-se um volume de solução de pré-hibridação de 10 ml por membrana (para cilindros de 200 mL - <http://cafe.cbmeg.unicamp.br/protoc/northern.htm>). A solução de pré-hibridação utilizada foi a mesma utilizada para Southern (5X SSC, 5X Denhardt's, 50mM Fosfato de sódio pH 6.8, 1 % SDS, 50 % Formamida e 100 μ g/ml DNA de esperma de salmão desnaturado), de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

As sondas em banho de gelo foram colocadas em um tubo de 50 mL contendo 5 mL de solução de hibridação (5X SSC, 5 % Sulfato de dextran, 20mM Fosfato de sódio pH 6.8, 1 % SDS, 50 % formamida) pré-aquecida a 65 °C.

Descartou-se a solução de pré- hibridação e verteu-se no cilindro de hibridação 5 mL de solução por membrana (para cilindros de 200 mL - <http://cafe.cbmeg.unicamp.br/protoc/northern.htm>), contendo a sonda marcada. A hibridação ocorreu a 42 °C durante 18 horas, sendo que ao término do processo a solução contendo as sondas marcadas foi descartada em depósito apropriado para rejeito radiativo. Após a hibridação, as membranas foram lavadas em condições de alta estringência (solução de 0,2X SSC e 0,1 % SDS à 65 °C). Foram utilizados 40 mL de solução a temperatura ambiente, sendo que a lavagem foi feita ainda em cilindros de hibridação, por duas vezes. Posteriormente, a membrana foi colocada em recipiente plástico com aproximadamente 200 mL de solução à temperatura ambiente e mantida sob agitação por 10 minutos. Foi feita ainda uma última lavagem com 200 mL de solução a 65 °C, por 20 minutos. Em seguida, as membranas foram envolvidas em filme plástico e expostas a filme de raios-X, dentro de cassetes apropriados durante 24 e 48 horas, em freezer a -70 °C.

5. RESULTADOS

5.5. Efeito do estresse salino sobre eficiência fotoquímica

5.5.1. Rendimento quântico do PSII (Fv/Fm)

Com o objetivo de avaliar o efeito dos íons Na^+ e Cl^- sobre o rendimento quântico do PSII (Fv/Fm), plantas de cana-de-açúcar foram submetidas a diferentes concentrações de sal (1 % e 1,7 % de NaCl), durante 72 horas. A figura sete mostra que o estresse salino, nas duas concentrações, não causou a diminuição da atividade fotossintética, caracterizada pelo rendimento quântico (Fv/Fm). Em condições controle e estressante as plantas apresentaram valores de Fv/Fm próximos a 0,7.

5.5.2. *Quenching* fotoquímico (qP)

A dissipação ocasionada pela utilização da energia absorvida pelo processo fotoquímico também foi calculada indiretamente pelo qP. Como pode ser visualizado na figura oito, houve um pequeno decréscimo dos valores de qP para a cultivar RB72454 nas primeiras 12 horas de estresse a 1% de NaCl com

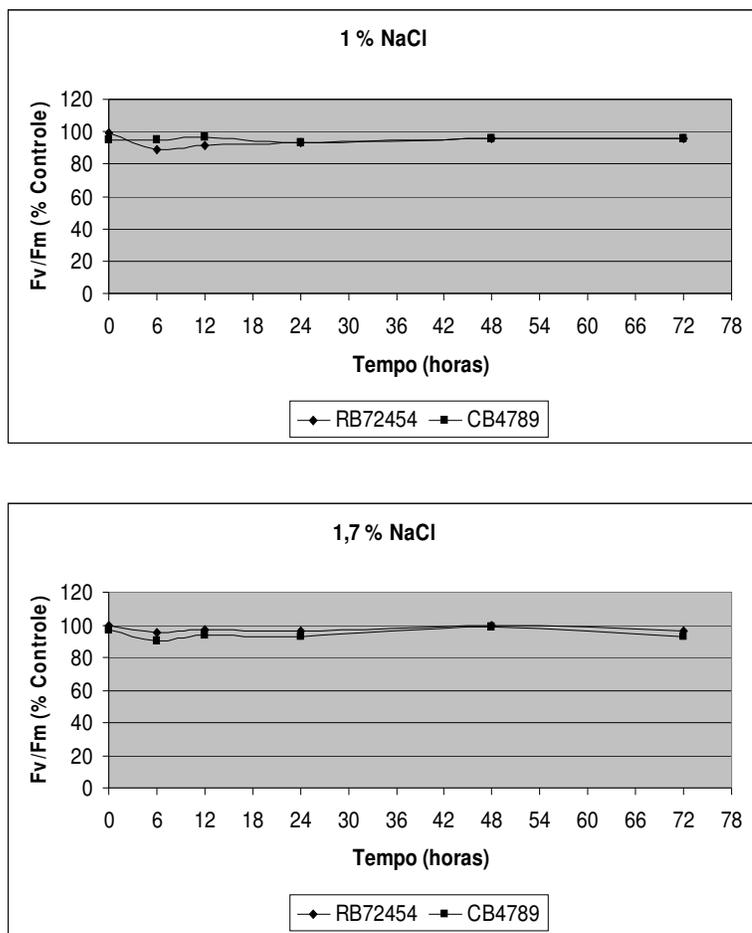


Figura 7 - Efeito da salinidade sobre a eficiência quântica (F_v/F_m). Duas cultivares de cana-de-açúcar (RB72454 e CB4789) foram submetidas a diferentes concentrações de sal (1,0 % e 1,7 % de NaCl) em diferentes tempos de exposição ao estresse (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas). As medições foram efetuadas pela utilização de um fluorímetro de luz modulada. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Cada ponto corresponde à média de seis repetições.

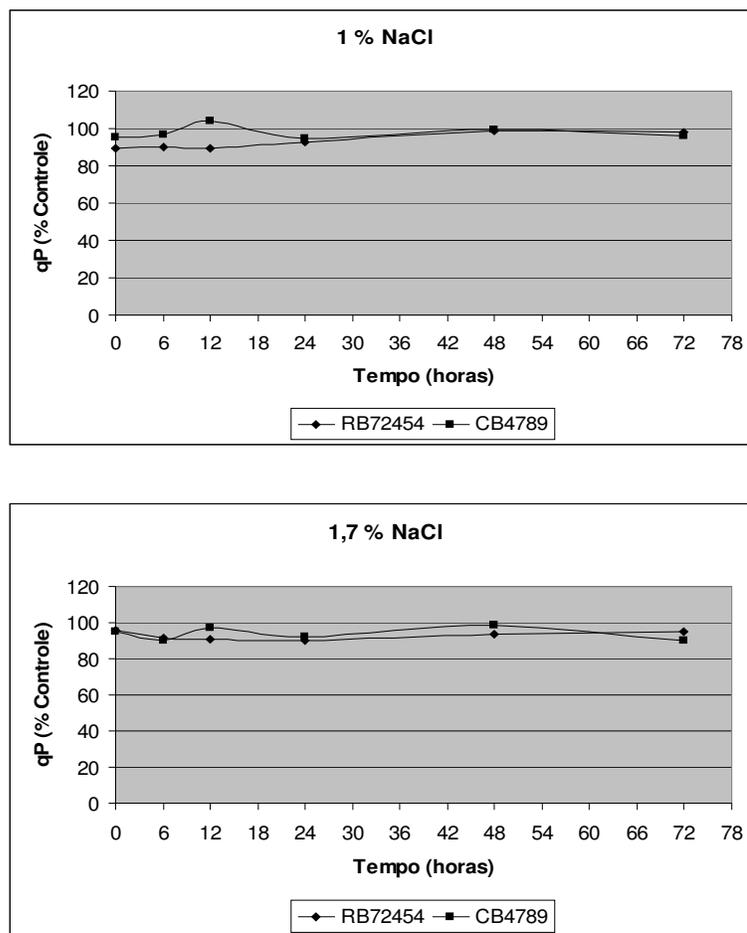


Figura 8 - Efeito da salinidade sobre *quenching* fotoquímico (qP). Duas cultivares de cana-de-açúcar (RB72454 e CB4789) foram submetidas a diferentes concentrações de sal (1,0 % e 1,7 % de NaCl) em diferentes tempos de exposição ao estresse (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas). As medições foram efetuadas pela utilização de um fluorímetro de luz modulada. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Cada ponto corresponde à média de seis repetições.

posterior recuperação até às 48 horas. Com relação à cultivar CB4789, nota-se que, às 12 horas de estresse, há um sutil aumento no qP em relação à cv. RB72454. No entanto, com a continuação do tratamento, ambas cultivares apresentaram de modo semelhante uma subsequente estabilização. Para o estresse a 1,7 %, foi verificada uma diminuição do qP nas duas cultivares para as primeiras seis horas. Com 12 horas de tratamento, a cv. RB72454 apresentou uma aparente estabilização, com posterior redução às 48 horas de estresse. Durante as 66 horas finais de estresse, as duas cultivares apresentaram valores constantes de qP, porém inferiores ao controle.

5.5.3. *Quenching* não-fotoquímico (qN)

O *quenching* não-fotoquímico representa a dissipação da energia absorvida por outras formas, principalmente por calor. Na figura nove observa-se que a 1 % de NaCl ambas cultivares apresentaram valores de qN semelhantes ao controle, no tempo zero. Para a cv. RB72454 foi observado um aumento nos valores de qN nas primeiras seis horas. Em contraste, a cv. CB4789 mostrou-se estável. Entre seis e 12 horas, verifica-se um decréscimo acentuado em ambas cultivares, com posterior estabilização do *quenching* na cv. RB72454 de 24 às 72 horas. Para a cv. CB4789 observa-se um forte aumento nos valores de qN em 24 horas. Porém, a partir de 48 horas, essa cultivar também apresentou valores de qN estáveis até o final do tratamento. Na presença de 1,7 % de NaCl, observa-se que a cv. CB4789 apresenta acréscimo acentuado nas primeiras 12 horas, com posterior redução até 24 horas. Com relação à cultivar RB72454, nota-se uma pequena redução nas primeiras seis horas de tratamento, apresentando em seguida forte aumento dos valores de qN e posterior decréscimo até às 24 horas. Nas 48 horas subsequentes de estresse, ambas cultivares apresentaram-se estáveis, com valores próximos ao controle.

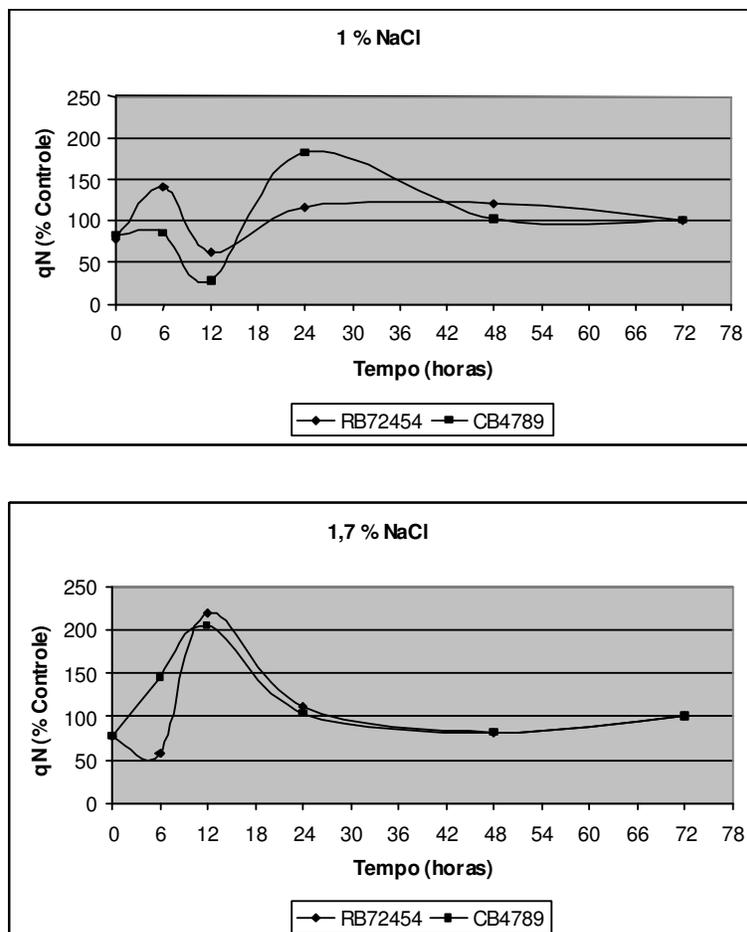


Figura 9 - Efeito da salinidade sobre *quenching* não-fotoquímico (qN). Duas cultivares de cana-de-açúcar (RB72454 e CB4789) foram submetidas a diferentes concentrações de sal (1,0 % e 1,7 % de NaCl) em diferentes tempos de exposição ao estresse (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas). As medições foram efetuadas pela utilização de um fluorímetro de luz modulada. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Cada ponto corresponde à média de seis repetições.

5.6. Efeito da salinidade sobre a intensidade da coloração verde da folha

Foi avaliada a alteração na intensidade da coloração verde (teor de clorofila) de folhas em condições controle e estressadas a 1 % e 1,7 % de NaCl, por 72 horas. Observa-se na figura 10 que as cultivares analisadas apresentaram um pequeno aumento nas primeiras seis horas de estresse, com posterior decréscimo nas seis horas subseqüentes. Nos intervalos entre 12 e 24 horas, nota-se uma sutil redução dos valores de SPAD para a cv. RB72454. Entretanto, com a continuação do tratamento, essa cultivar mostra-se aparentemente estável até 48 horas, apresentando posteriormente um pequeno decréscimo às 72 horas. Para a cv. CB4789, verifica-se que às 24 horas, há um aumento na intensidade da coloração, com subseqüente decréscimo entre os intervalos de 24 e 48 horas. Após esse período, a cv. analisada apresenta-se estável. Na presença de 1,7 % de NaCl observou-se que nas primeiras 24 horas ocorreu um aumento na intensidade de verde da cv. RB72454. Porém, após o intervalo de 24 horas, nota-se um decréscimo contínuo até o final do ensaio. Com relação a cv. CB4789, os valores de SPAD apresentam-se constantes até às 24 horas. Porém, entre 24 e 48 horas nota-se um considerável aumento da intensidade da cor verde da folha, apresentando posteriormente uma forte redução.

5.7. Alterações na peroxidação de lipídeos em plantas submetidas à salinidade

O efeito da salinidade sobre a peroxidação de lipídeos foi analisada em três cultivares de cana-de-açúcar. As plantas foram avaliadas em condições controle e estressante (1 % e 1,7 % de NaCl) nos intervalos de zero, 24 e 48 horas. Como pode ser observado na figura 11, os níveis de peroxidação, representados pela concentração de ácido tio-barbitúrico (TBARS), são distintos nas duas cultivares. A cv. RB72454 apresenta uma menor concentração de espécies reativas a TBARS em relação à cv. CB4789. Isso pode ser verificado nos três tratamentos impostos (Controle, 1 % e 1,7 % de NaCl). No entanto, nota-se um incremento na concentração de TBARS quando aumenta-se o tempo de exposição e a concentração de sal. Observa-se que a cv. CB4789 apresenta altos níveis de

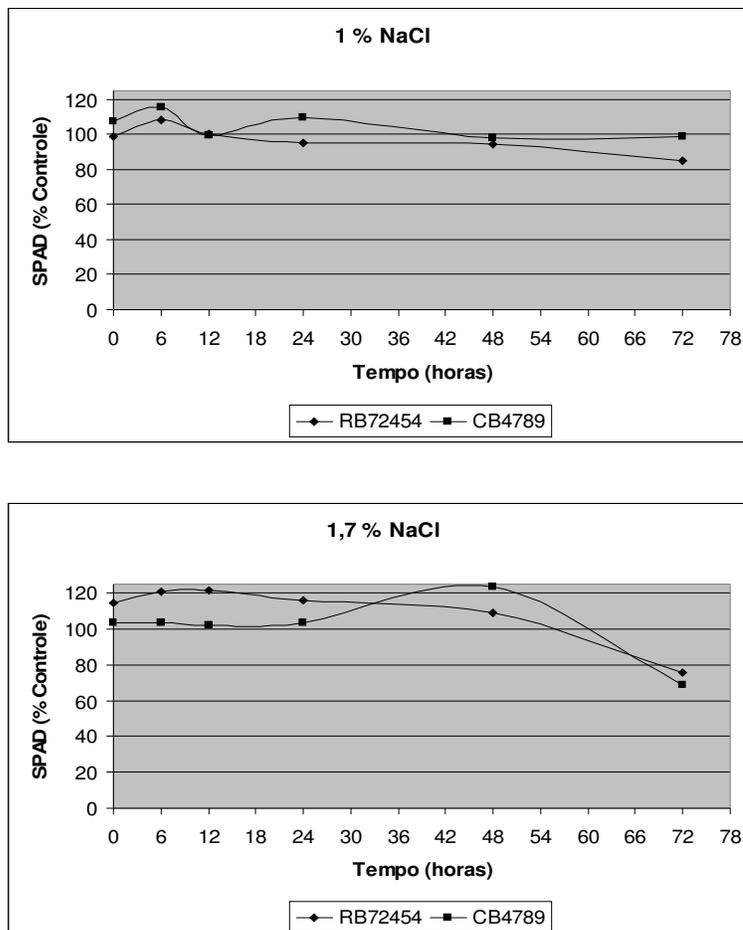


Figura 10 – Alterações na intensidade da coloração verde em plantas submetidas à salinidade. Duas cultivares de cana-de-açúcar (RB72454 e CB4789) foram submetidas a diferentes concentrações de sal (1,0 % e 1,7 % de NaCl) em diferentes tempos de exposição ao estresse (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas). As medições foram efetuadas pela utilização do clorofilômetro SPAD-502. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Cada ponto corresponde à média de seis repetições

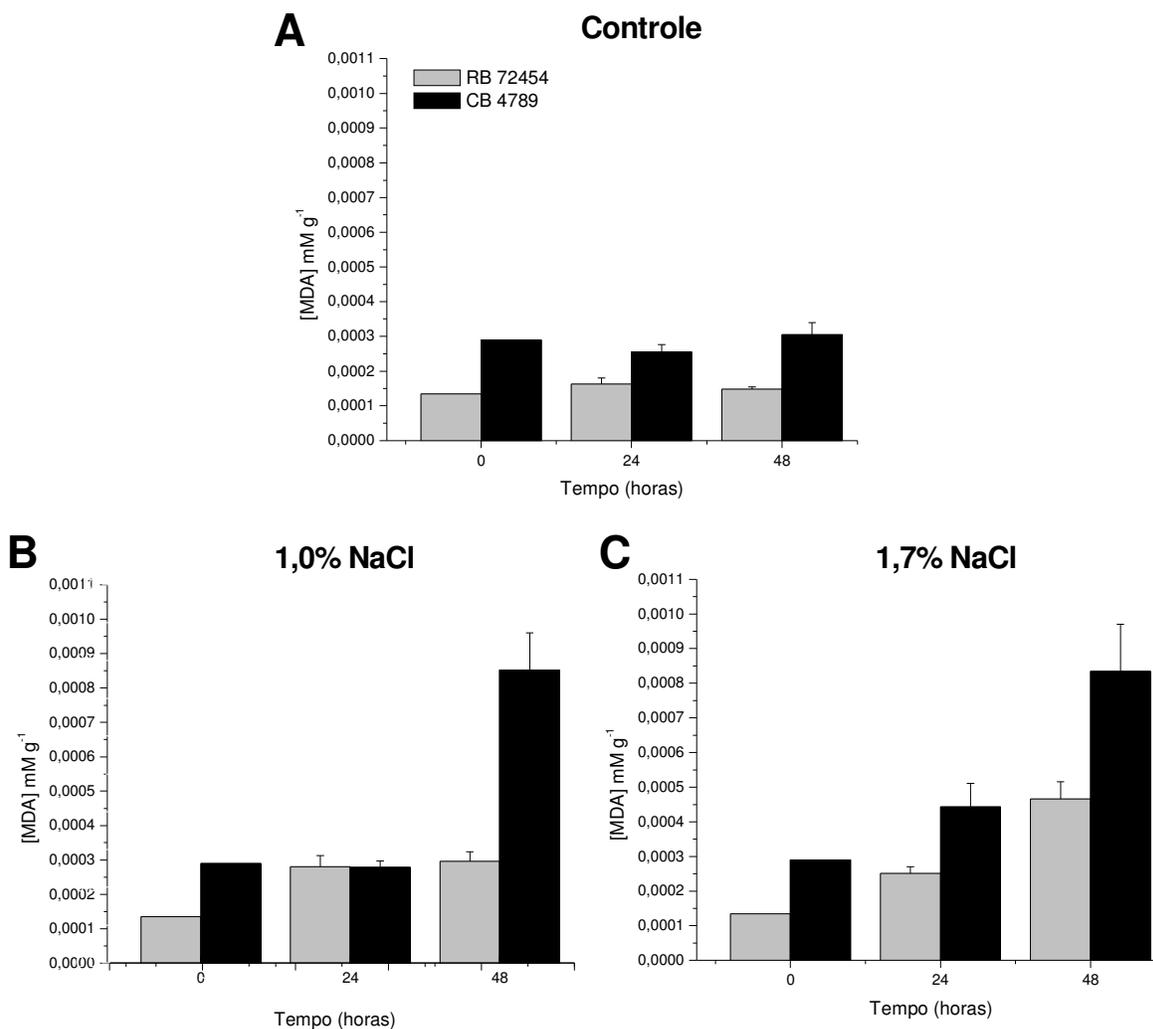


Figura 11 - Efeito da salinidade sobre a peroxidação de lipídeos. Duas cultivares de cana-de-açúcar (RB72454 e CB4789) foram submetidas a diferentes concentrações de sal (1,0 % e 1,7 % de NaCl) em diferentes tempos de exposição ao estresse (0, 24 e 48 horas). A peroxidação de lipídeos foi determinada, indiretamente, pelo conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em mM por grama de tecido vegetal. A) Plantas em solução nutritiva. B) Plantas em solução nutritiva acrescida de 1,0 % de NaCl. C) Plantas em solução nutritiva acrescida de 1,7 % de NaCl. As barras representam o erro padrão da média. Cada coluna corresponde à média de cinco repetições.

peroxidação em resposta à salinidade e um incremento de TBARS também em condições controle quando comparado a cv. RB72454.

5.8. Amplificação dos genes cloroplastídicos relacionados ao processo fotoquímico

Com o objetivo de amplificar os genes cloroplastídicos cujas proteínas estão relacionadas ao processo fotoquímico na membrana tilacoidal, foram utilizados iniciadores específicos que flanqueiam o início e o final dos genes. A figura 12 mostra o resultado da amplificação dos 13 genes correspondentes ao PSII. Com relação ao complexo citocromo b_6f , observa-se na figura 13 a amplificação de quatro genes. De forma semelhante, foram também amplificados um total de três genes pertencentes ao PSI (Figura 14) e seis do complexo ATPsintase (Figura 15). A partir dos resultados pode-se verificar que as condições da reação possibilitaram uma amplificação eficiente de todos os genes através dos iniciadores desenhados. Adicionalmente, todos os produtos amplificados tiveram suas seqüências confirmadas por reações de seqüenciamento.

5.6. Caracterização parcial do perfil de expressão dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD*, através da técnica de northern blotting

5.6.1. Análise da expressão dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD* em plantas submetidas à estresse salino

A caracterização dos genes expressos em resposta à salinidade revelou uma expressão diferencial em relação às cultivares, tempo de exposição e concentração de sal. Verifica-se na figura 16E a concentração e qualidade dos extratos de RNA. Na cv. RB72454 observa-se que o gene *psbA* (Figura 16A) é sutilmente reprimido em resposta a 1 % de NaCl. Em contraste, a cv. CB4789 apresenta forte indução do gene analisado. Porém, com relação aos genes *psbB*, *psbC* e *psbD*, em 1 % de sal (Figuras 16B, 16C e 16D, respectivamente), a intensidade da banda é reduzida em ambas cultivares.

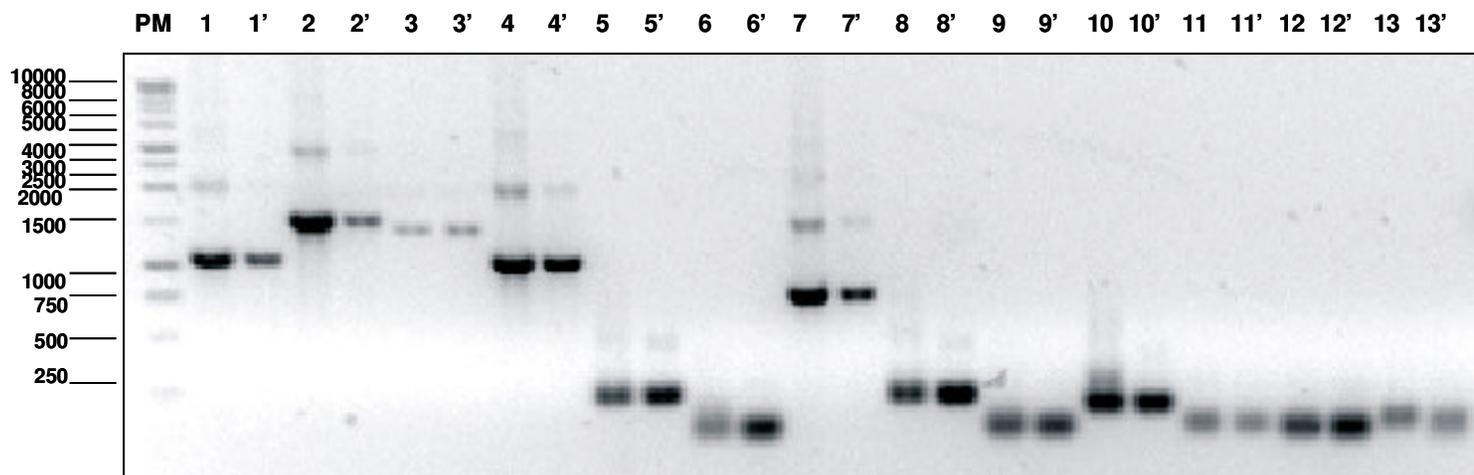


Figura 12 - Foto do gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo, contendo genes cloroplastídicos amplificados (*pbbA* –1067 pb, *psbB* – 1530 pb, *psbD* – 1060 pb, *psbE* – 255 pb, *psbF* - 120 pb, *psbG* – 750 pb, *psbH* – 250 pb, *psbI* – 113 pb, *psbK* – 200 pb, *psbL* – 120 pb, *psbM* – 115 pb e *psbN* – 134 pb), correspondentes ao complexo protéico PSII. Foram utilizadas plantas de arroz da cultivar TN1 (rais 1 a 13) e plantas de cana-de-açúcar da cultivar RB72454 (raias 1' a 13'). A reação em cadeia de polimerase dos genes descritos acima consistiu na utilização de iniciadores específicos, desenhados a partir do genoma do cloroplasto de arroz, previamente depositado no banco de dados (Gene Bank).

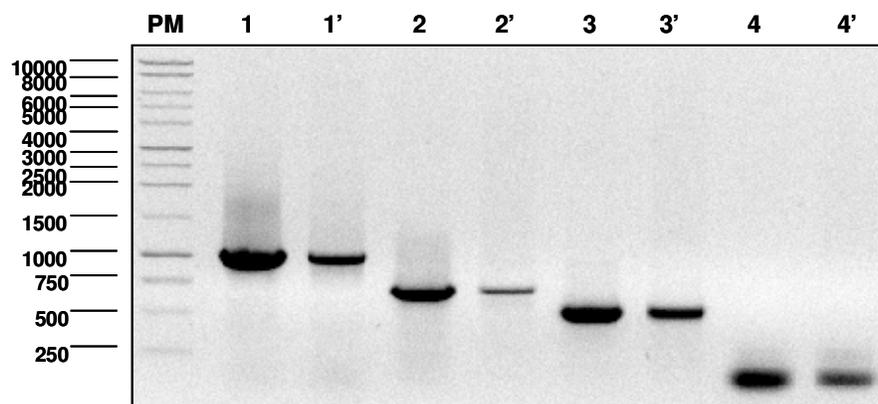


Figura 13 - Foto do gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo, contendo genes cloroplastídicos amplificados (*petA* – 970 pb, *petB* – 650 pb, *petD* – 500 pb e *petE* – 130 pb), correspondentes ao complexo protéico Citocromo b_6f . Foram utilizadas plantas de arroz da cultivar TN1 (raias 1, 2, 3 e 4) e plantas de cana-de-açúcar da cultivar RB72454 (raias 1', 2', 3' e 4'). A reação em cadeia de polimerase dos genes descritos acima consistiu na utilização de iniciadores específicos, desenhados a partir do genoma do cloroplasto de arroz, previamente depositado no banco de dados (Gene Bank).

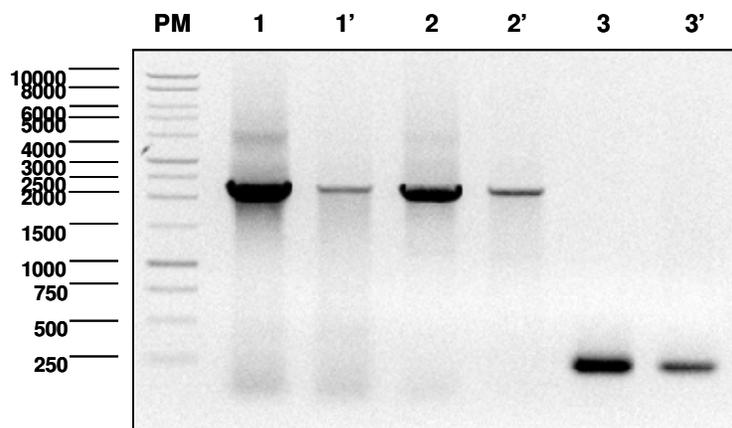


Figura 14 - Foto do gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo, contendo genes cloroplásticos amplificados (*psaA* – 2255 pb, *psaB* – 2200 pb e *psaC* – 250 pb), correspondentes ao complexo protéico PSI. Foram utilizadas plantas de arroz da cultivar TN1 (raias 1, 2, 3 e 4) e plantas de cana-de-açúcar da cultivar RB72454 (raias 1', 2', 3' e 4'). A reação em cadeia de polimerase dos genes descritos acima consistiu na utilização de iniciadores específicos, desenhados a partir do genoma do cloroplasto de arroz, previamente depositado no banco de dados (Gene Bank).

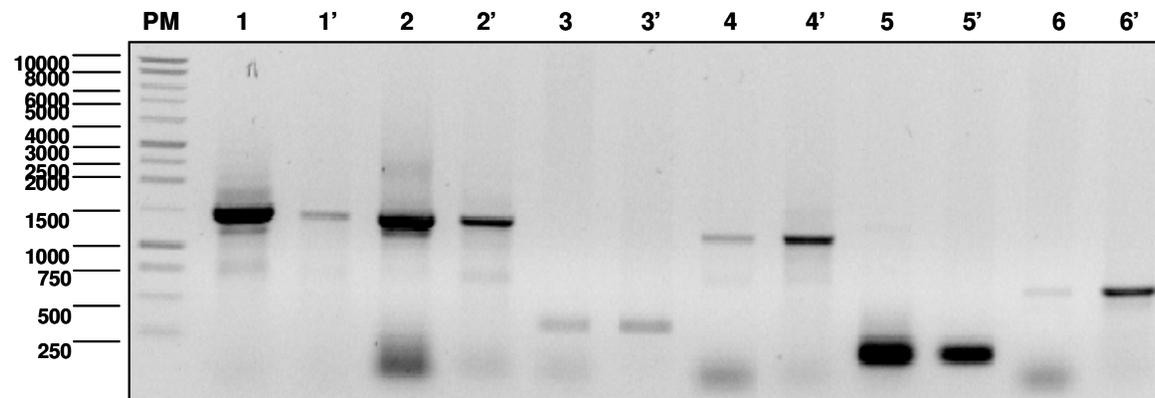


Figura 15 - Foto do gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo, contendo genes cloroplastídicos amplificados (*atpA* – 1500 pb, *atpB* – 1500 pb, *atpE* – 415 pb, *atpF* – 1300 pb, *atpH* - 250 pb e *atpI* – 750 pb), correspondentes ao complexo protéico ATP sintase. Foram utilizadas plantas de arroz da cultivar TN1 (raias 1 a 6) e plantas de cana-de-açúcar da cultivar RB72454 (raias 1' a 6'). A reação em cadeia de polimerase dos genes descritos acima consistiu na utilização de iniciadores específicos, desenhados a partir do genoma do cloroplasto de arroz, previamente depositado no banco de dados (Gene Bank).

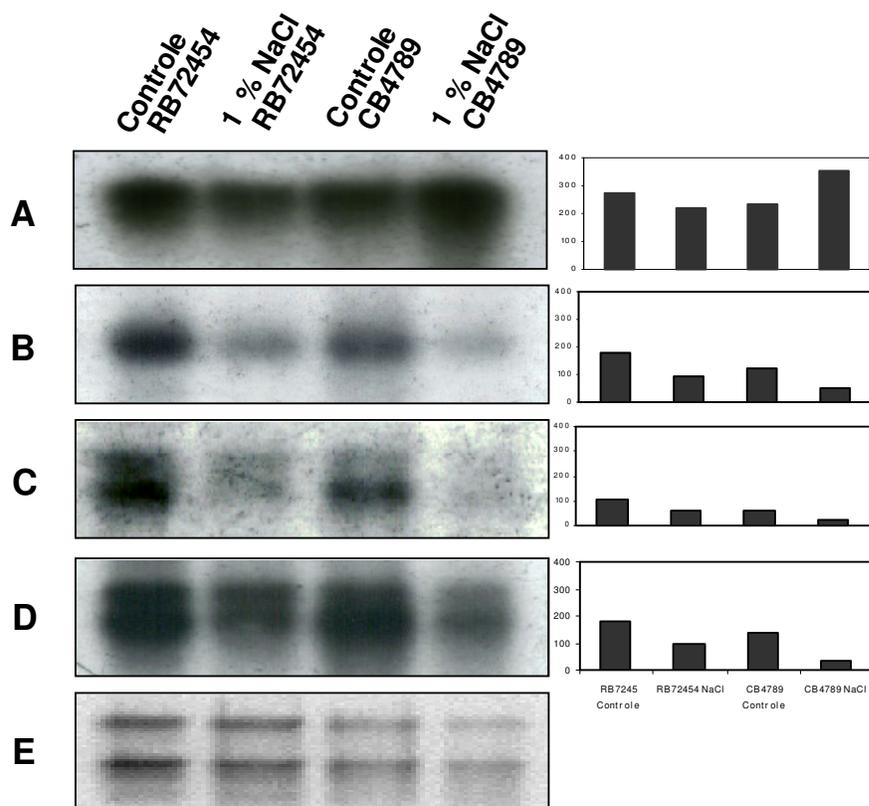


Figura 16 - Expressão diferencial dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD* em duas cultivares de cana-de-açúcar (RB72454 e CB4789) submetidas a 1 % de NaCl durante 24 horas. Ensaio de “*northern blotting*” utilizando RNA total na presença de sondas dos genes *psbA* (A), *psbB* (B), *psbC* (C) e *psbD* (D), marcados radioativamente com dCTP32. (E) Foto do gel de agarose 1,2 %, contendo 10 µg de RNA total que foram transferidos para a membrana de nylon.

A resposta dos genes às diferentes concentrações de sal (0,5 %, 1 % e 1,7 %) foi analisada para o tempo de 24 horas. Na figura 17A a intensidade da banda correspondente ao gene *psbA* foi reduzida no tratamento a 0,5 %, e comportou-se de maneira semelhante em resposta a 1 % de NaCl. Entretanto, com relação ao estresse a 1,7 %, verificou-se uma pequena indução deste gene. Resposta semelhante pode ser visualizada na intensidade da banda referente ao gene *psbB* (Figura 17B). Porém, com o aumento do estresse para 1,7 % de sal, nenhuma indução foi evidenciada. Com relação aos genes *psbC* (Figura 17C) e *psbD* (Figura 17D) um decréscimo de transcritos pode ser verificado no estresse a 1 % de NaCl. No entanto, quando as plantas foram impostas a 1,7 % de sal, nota-se um pequeno aumento na intensidade da banda.

5.6.2. Efeito de diferentes estresses (1 % NaCl, 15 % PEG, 1 % KCl e Ferimento) sobre a expressão dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD*

Em resposta a diferentes estresses como 1 % de NaCl, 15 % de PEG, 1 % de KCl e Ferimento, durante o tempo de 24 horas, também observa-se uma expressão diferencial dos genes estudados. Observa-se na figura 18 que os níveis de transcritos de todos os genes são reduzidos a 1% de NaCl e 15 % de PEG. Entretanto, maiores decréscimos podem ser visualizados na expressão dos genes *psbB*, *psbC* e *psbD* (Figuras 18B, 18C e 18D), em contraste com a expressão do gene *psbA*, que apresentou uma sutil repressão. Com relação ao estresse a 1 % de KCl, foi verificado um aumento na expressão de todos os genes analisados. Para o estresse por ferimento, nenhuma alteração foi observada nos transcritos de *psbA*, *psbC* e *psbD*, no entanto, nota-se que para o gene *psbB* há um aumento dos níveis de transcritos.

5.6.3. Efeito da temperatura sobre expressão dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD*

O efeito térmico sobre a expressão dos genes foi analisado em plantas de cana-de-açúcar da cv. RB72454 submetidas à alta (44 °C) e baixa (6 °C) temperatura. Verifica-se na figura 19 que a expressão dos genes *psbA*, *psbB* e

psbD (figuras 19A, 19B e 19D, respectivamente) é reprimida em condições de alta temperatura. Em contraste, pode-se visualizar que o gene *psbC* (Figura 19C) não tem sua expressão alterada.

Para o estresse por baixa temperatura, observa-se que os genes *psbA* e *psbB* não tem alteração na intensidade das bandas, em contraste com o gene *psbC*, que foi fortemente reprimido, e com *psbD*, que apresentou uma sutil inibição.

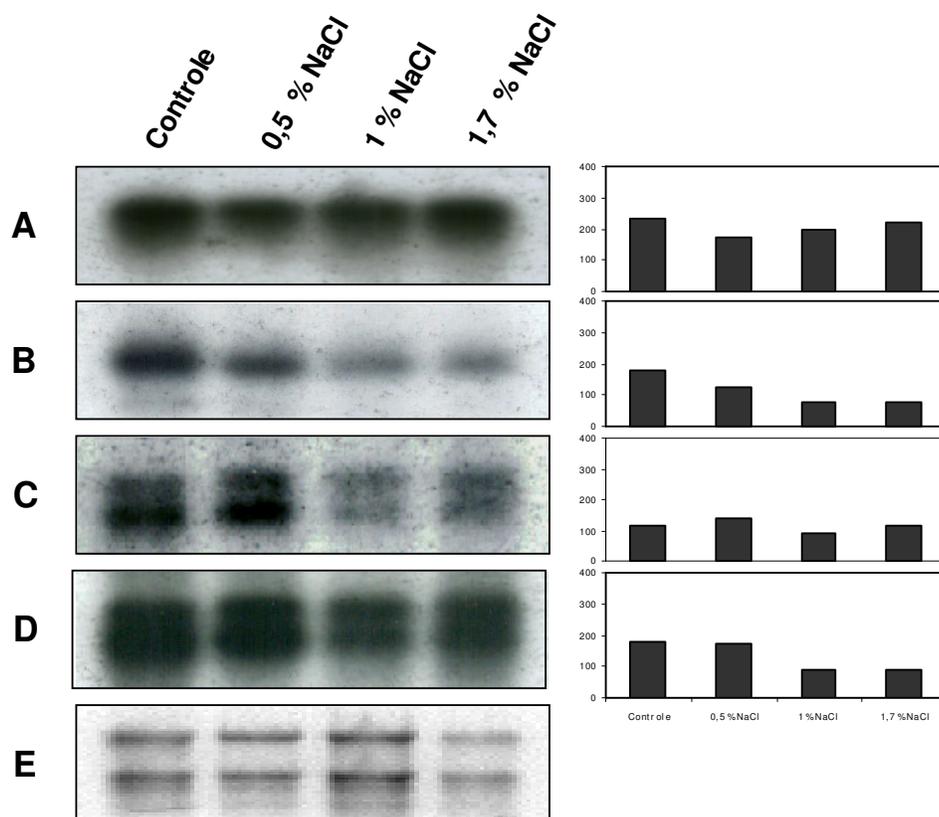


Figura 17 - Expressão diferencial dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD* em plantas de cana-de-açúcar cv. RB72454 expostas a diferentes concentrações de NaCl (0,5 %, 1,0 % e 1,7 %), durante 24 horas. Ensaio de “*northern blotting*” utilizando RNA total na presença de sondas dos genes *psbA* (A), *psbB* (B), *psbC* (C) e *psbD* (D), marcados radioativamente com dCTP32. (E) Foto do gel de agarose 1,2 %, contendo 10 µg de RNA total que foram transferidos para a membrana de nylon.

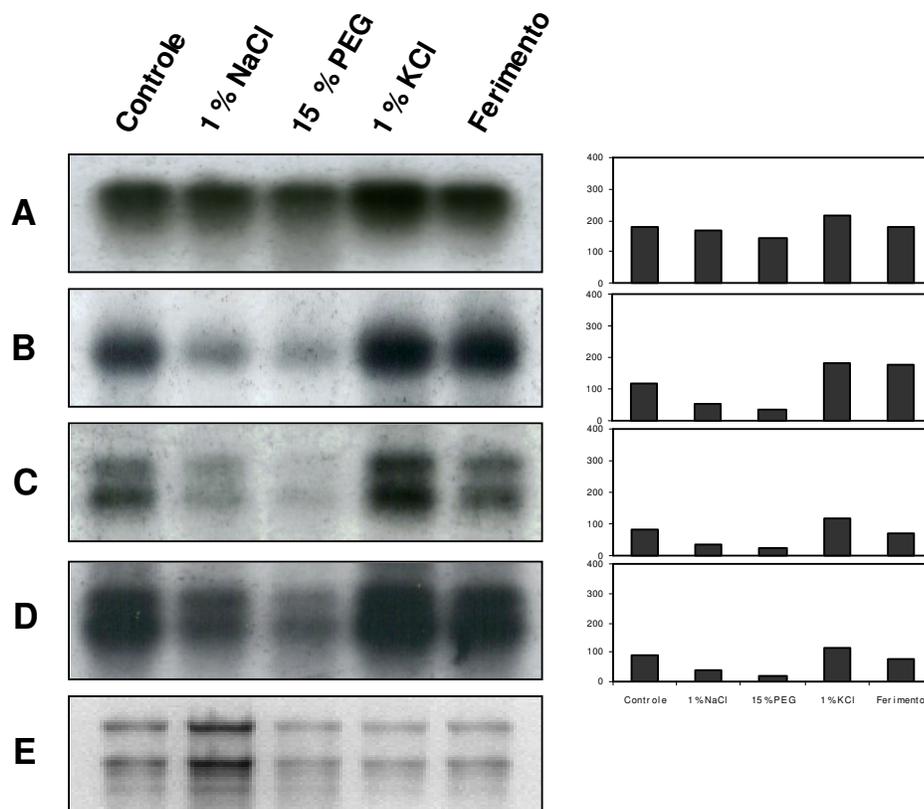


Figura 18 - Expressão diferencial dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD* em plantas de cana-de-açúcar cv. RB72454 expostas a diferentes estresses (1,0 % de NaCl, 15 % PEG, 1,0 % KCl e Ferimento). Ensaio de “*northern blotting*” utilizando RNA total na presença de sondas dos genes *psbA* (A), *psbB* (B), *psbC* (C) e *psbD* (D), marcados radioativamente com dCTP32. (E) Foto do gel de agarose 1,2 %, contendo 10 µg de RNA total que foram transferidos para a membrana de nylon.

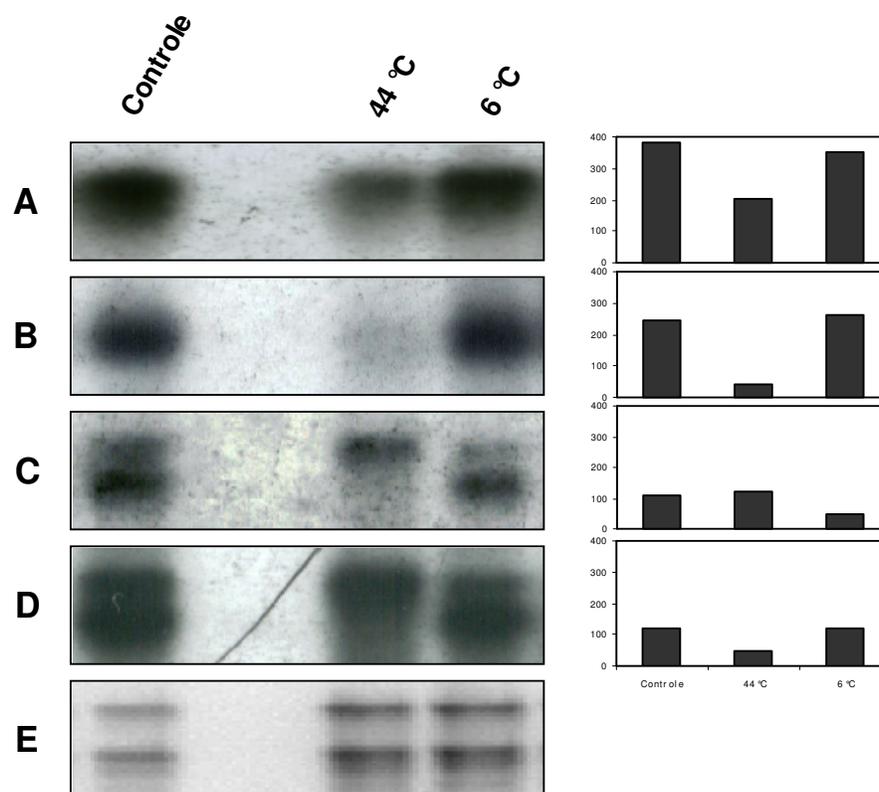


Figura 19 - Expressão diferencial dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD* em plantas de cana-de-açúcar cv. RB72454 expostas à alta (44 °C) e baixa temperatura (6 °C). Ensaio de “*northern blotting*” utilizando RNA total na presença de sondas dos genes *psbA* (A), *psbB* (B), *psbC* (C) e *psbD* (D), marcados radioativamente com dCTP32. (E) Foto do gel de agarose 1,2 %, contendo 10 µg de RNA total que foram transferidos para a membrana de nylon.

6. DISCUSSÃO

Avaliou-se neste trabalho o efeito dos íons Na^+ e Cl^- sobre características fisiológicas, bioquímicas e moleculares de duas cultivares de cana-de-açúcar.

Diversos trabalhos têm demonstrado o dano ocasionado pela salinidade sobre a eficiência fotossintética (de Souza Filho *et al.*, 2003; Tezara *et al.*, 2003; Lu e Vonshak, 2002). Sabe-se que a fluorescência da clorofila *a* é uma das características fisiológicas mais utilizadas para comparar diferentes espécies e variedades em resposta a estresses ambientais (Mekkaoui *et al.*, 1989; Monneveux *et al.*, 1990). Dessa forma, no intuito de avaliar o efeito do estresse salino sobre a eficiência fotoquímica, plantas de cana-de-açúcar foram submetidas a diferentes concentrações de sal (1 % e 1,7 %), em diferentes tempos de exposição ao agente estressante (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas). Para a característica Fv/Fm, ambas cultivares revelaram que os estresses a 1% e 1,7 % não foram suficientes para inibir o rendimento quântico do PSII durante as 72 horas de estresse. Esses resultados corroboram com os dados encontrados por Robinson *et al.* (1983), Brugnoli e Björkman (1992), Morales *et al.* (1992) e Abadía *et al.* (1999), que também não observaram decréscimo na razão Fv/Fm.

Quando uma molécula de pigmento absorve energia luminosa e torna-se excitada, existem várias formas de essa molécula retornar ao seu estado basal. A

transferência de elétrons é uma delas. Essa dissipação de energia é conhecida como *quenching* fotoquímico. Porém, quando a energia luminosa incidente excede a capacidade de absorção, esse estado excitado pode dissipar essa energia por rotas não desejáveis. O mecanismo de proteção contra esse eminente dano ao sistema é denominado *quenching* não-fotoquímico (Merchant e Sawaya, 2005). Nesse contexto, foram feitas análises de qP e qN. Em ambas as cultivares verifica-se que durante os dois tratamentos impostos, os valores de qP mantiveram-se semelhantes ao controle, não apresentando redução aparente nestes valores. De acordo com Biehler e Fock (1996), uma resposta semelhante pode ser observada em trigo, que também não apresentou decréscimos nos valores de qP. Porém, resultados contrastantes foram obtidos com girassol, que apresentou uma severa redução (Scheuermann, 1991). Com relação ao qN, observam-se oscilações nas primeiras 48 horas de estresse com 1 % de NaCl, com posterior estabilização nas duas cultivares. Para o estresse a 1,7 % o aumento nos valores de qN foram notados somente nas 24 horas iniciais, observando-se que entre 24 e 72 horas as cultivares analisadas aparentam estabilidade em relação a qN. Esses resultados sugerem que a cana-de-açúcar, que é uma planta C4, é capaz de manter sua eficiência quântica, apresentando alterações somente nos valores de *quenching*.

Para um melhor entendimento dos resultados das variáveis de fluorescência (Fv/Fm, qP e qN), avaliou-se a intensidade de coloração verde em folhas de plantas submetidas aos tratamentos com NaCl. Geralmente, as técnicas utilizadas para a extração de pigmentos fotossintéticos são baseadas em métodos que utilizam solventes orgânicos como acetona (Bruisna, 1961), dimetilsulfóxido (DMSO) (Shoaf e Lium, 1976), metanol (Lichtenthaler e Wellburn, 1983), entre outros. Entretanto, esses métodos requerem a destruição do tecido, além da possibilidade da ocorrência de degradação ou alguma outra variação que possa interferir nos resultados (Netto *et al.*, 2002). Assim, a utilização do clorofilômetro SPAD-502 foi uma forma rápida, precisa e não destrutiva encontrada para avaliar possíveis danos ocasionados ao aparelho fotossintético durante o estresse. Então, comparando-se o teor de clorofila nas cultivares analisadas verificou-se pequenas alterações na concentração desses pigmentos em plantas expostas a 1 % de sal. Todavia, durante todo o estresse nota-se que os valores de SPAD em plantas estressadas por sal mantiveram-se próximos ao controle, sendo que a cv.

RB72454 apresentou decréscimos mais evidentes quando comparada à outra cultivar. Os resultados encontrados para o estresse a 1 % corroboram com as análises feitas por Lu *et al.* (2003), que também não observou alterações significativas em *Artimisia anethifolia*. Quando as plantas foram submetidas a um estresse mais severo (1,7 % de NaCl), nota-se um aumento na intensidade de coloração verde nas folhas de CB4789 nas horas iniciais de estresse, em contraste com RB72454, que apresentou acréscimo por volta de 48 horas de tratamento. No entanto, observa-se que apesar do aparente aumento do teor de clorofila, ambas cultivares apresentaram redução nos valores de SPAD às 72 horas, demonstrando que um estresse mais severo foi capaz de afetar a concentração de clorofila. As análises acerca do teor de pigmento são importantes indicadores de senescência (Brown *et al.*, 1991) e indicadores potenciais de estresses abióticos, servindo como diagnóstico. Segundo Gabrielsen (1948), os teores de pigmento influenciam as taxas fotossintéticas se estiverem abaixo da concentração ótima para este processo.

Uma outra alteração bioquímica que ocorre em plantas sujeitas ao estresse salino é a peroxidação de lipídeos. Essa decomposição dos ácidos graxos poli-insaturados de biomembranas é resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Pela quantificação dos teores de TBARS, verificou-se que a cv. CB4789 apresenta níveis de peroxidação maior que a cv. RB72454, mesmo em condições controle. Quando as plantas foram submetidas às diferentes concentrações de sal, a cv. CB4789 continuou apresentando maior peroxidação. Além disso, observa-se que quanto maior a concentração de NaCl e o tempo de exposição ao NaCl, maior também será o conteúdo de TBARS. A partir desses resultados, pode-se sugerir que a cv. RB72454 pode possuir um sistema de proteção contra o estresse oxidativo mais eficiente, quando comparada com CB4789, ou sua produção de ROS ocorra em níveis muito mais baixos. Se correlacionarmos os valores de qN com os dados de peroxidação de lipídios, verifica-se que a cv. CB4789 após 24 horas de estresse com 1 % de NaCl passa por um aumento do qN e, no entanto, sua peroxidação não é aparente. Isso permite sugerir que a elevação do *quenching* não-fotoquímico estaria atuando na preservação do sistema contra o estresse oxidativo. Essa comparação pode ser visualizada também no estresse com 1,7 %, pois quando os valores de qN não são alterados em resposta ao estresse ocorre aumento no conteúdo de TBARS.

Com o objetivo de amplificar os genes cloroplastídicos cujas proteínas estão relacionadas ao processo fotoquímico na membrana tilacoidal, foram selecionadas regiões que flanqueiam o início e o final dos genes. Para esse fim, foram utilizadas seqüências do plastoma de arroz correspondentes aos genes de interesse. A partir dessas seqüências foram desenhados os iniciadores que permitiram a amplificação das seqüências gênicas completas. Os resultados obtidos mostraram que as condições utilizadas na reação via PCR foram eficazes, permitindo a amplificação de todos os fragmentos, tendo ainda suas seqüências confirmadas por seqüenciamento. Nesse sentido, devido à eficiência de todos os iniciadores, pode-se sugerir que a homologia entre as espécies não é verificada somente nas proteínas, mas vê-se também que o plastoma é bastante conservado entre as espécies.

Visando avaliar o efeito da salinidade e de outros estresses, sobre a regulação de genes componentes dos complexos protéicos da fotossíntese, quatro genes correspondentes às principais proteínas componentes do fotossistema II foram selecionados para análises de expressão via “northern blot”. A análise dos níveis de expressão dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD* foram feitas em plantas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes condições.

Com a intenção de analisar se os quatro genes selecionados são regulados de forma diferencial nas duas cultivares, as plantas foram submetidas a 1 % de NaCl, durante 24 horas. Para o gene *psbA*, responsável por codificar a proteína D1, observou-se uma pequena repressão para a cv. RB72454, em contraste com a cv. CB4789, que apresentou indução do gene analisado. Sabe-se que a proteína D1 apresenta alta instabilidade em resposta a estresses ambientais (Pieters *et al.*, 2003; Vasilikiots e Melis, 1994) ocorrendo mudanças conformacionais e perda de sua atividade. Dessa maneira, pela ação de proteases (Haussuhl *et al.*, 2001), a proteína D1 é degradada, sendo necessária a síntese *de novo*. Acredita-se que essa degradação é proveniente da formação de ROS, pois, conforme reportado em trabalhos anteriores, essas moléculas podem agir sobre proteínas, pigmentos e lipídeos, degradando-os (Prasil *et al.*, 1992; Aro *et al.*, 1993). Esses dados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho para peroxidação, onde foi verificado que a cv. CB4789 apresenta maiores teores de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, o que poderia estar

resultando na maior degradação da proteína D1 e na conseqüente indução da transcrição de seu gene correspondente, *psbA*, visando sua reposição.

Com relação aos genes *psbB*, *psbC* e *psbD*, responsáveis por codificarem as proteínas CP47, CP43 e D2, respectivamente, verificou-se a diminuição dos níveis de transcritos em todos os três genes, para ambas cultivares. A repressão do gene *psbB* confirma os resultados encontrados por Chattopadhyay *et al.* (2002). Vários trabalhos têm demonstrado que os genes *psbC* e *psbD* são fortemente regulados por luz azul (Kim *et al.*, 1999, Christopher e Mullet, 1994; Sexton *et al.*, 1990). A regulação desses genes *psbC* e *psbD* em resposta ao estresse salino ainda não está elucidada. Porém, em resposta a luz verifica-se indução dos genes *psbC* e *psbD* (Hoffer e Christopher, 1997; Christopher *et al.*, 1997; Kim e Mullet, 1995; Christopher e Mullet, 1994), em contraste com a repressão observada nesse trabalho.

Ainda com relação aos genes *psbC* e *psbD*, sabe-se que suas seqüências apresentam sobreposição parcial no genoma (Kim *et al.*, 1999; Christopher e Mullet, 1994; Sexton *et al.*, 1990), sendo dessa forma um operon. Conseqüentemente, sondas produzidas a partir da região transcrita de cada um destes genes são capazes de reconhecer também os transcritos correspondentes ao outro gene. Ensaio de “northern blot” com sondas desta natureza, portanto, resultarão na detecção de duas bandas (*psbC*- 1420 pb e *psbD*-1060 pb), conforme observado em nossos ensaios.

Visando avaliar o efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a regulação dos quatro genes em estudo, a cv. RB72454 foi submetida a 0,5 %, 1 % e 1,7 % de NaCl. Verificou-se que o gene *psbA* foi reprimido em resposta aos estresses a 0,5 % e 1% de sal, porém, com relação ao estresse a 1,7 %, os níveis de transcritos foram semelhantes ao controle. Apesar de nenhuma alteração ter sido observada para 1,7 %, é possível que esse aumento de transcritos em relação aos outros estresses seja devido ao fato de que esse tratamento tenha sido mais severo, provocando uma maior degradação da D1 e, dessa forma, induzindo sua síntese *de novo*. Para os outros genes analisados (*psbB*, *psbC* e *psbD*), observou-se um pequeno decréscimo a 0,5 % de sal, em contraste com uma repressão mais evidente quando plantas foram submetidas a 1 % de NaCl. Na imposição do estresse a 1,7 %, verifica-se que os genes *psbC* e *psbD* comportam-se de forma semelhante ao gene *psbA*, tendo um aumento de

transcritos em resposta ao estresse em questão, sugerindo um possível turnover das proteínas CP43 e D2. Em contrapartida, o gene *psbB* continuou apresentando evidente repressão tanto para 1% quanto para 1,7 % de NaCl.

Adicionalmente, foram feitas análises para verificar a regulação desses genes em resposta a outros estresses. Para essa finalidade, plantas da cv. RB72454 foram submetidas a 1% de NaCl, utilizado como um controle positivo 15 % de PEG, um agente estressante que mimetiza o estresse por seca, 1 % de KCl, e ferimento. Para o estresse com 15 % de PEG, verificou-se que os genes *psbB*, *psbC* e *psbD* apresentaram uma forte redução dos níveis de transcritos, em contraste com uma sutil repressão observada para o gene *psbA*. Esses dados demonstram a existência de uma forte regulação desses genes em resposta ao déficit hídrico. Tal regulação é bastante similar àquela provocada por NaCl, sugerindo que considerável parcela da regulação provocada pela salinidade sobre tais genes seja resultante do componente osmótico desse estresse. Tal hipótese, entretanto, é fortemente contrastada pelos resultados opostos gerados pelo estresse provocado por KCl. Neste caso, a exposição ao sal resultou na indução da transcrição dos genes em que o efeito osmótico do estresse não resultou na repressão. Isso sugere que o mecanismo de resposta ao sal, não é apenas devido à deficiência hídrica ocasionada, mas sim íon-específica, em que Na⁺ e K⁺ desencadeiam sistemas de resposta distintos para a regulação dos genes. Com relação ao estresse por ferimento, não foram verificadas alterações na expressão dos genes *psbA*, *psbC* e *psbD*. Contudo, para o gene *psbB* nota-se um leve aumento nos níveis de transcritos.

Outro parâmetro analisado foi a expressão desses genes em resposta à alta (44 °C) e baixa (6 °C) temperatura. Para o estresse a 44 °C verificou-se que os genes *psbA*, *psbB* e *psbD* são reprimidos, contrastando apenas com o gene *psbC*, que não aparenta ser regulado por calor, após 24 horas. Os resultados encontrados são conflitantes quando comparados com Kusnetsov *et al.* (1993), que observou aumento nos níveis de transcritos para todos estes genes.

Quando as plantas foram submetidas a 6°C, não verifica-se alterações na expressão dos genes *psbA*, *psbB* e *psbD*. Em contraste, para o gene *psbC* foi observada a repressão de transcritos, indicando que tal gene responde ao estresse por frio após 24 horas de exposição.

Os resultados fornecidos pelo ensaio com diferentes temperaturas apresentaram dados interessantes. Foi observada a regulação independente dos genes *psbC* e *psbD* que, para os demais ensaios, apresentam-se co-regulados. Tal observação permite inferir sobre a existência de sistemas distintos para a regulação de tais genes, que permitam a expressão conjunta, sob determinadas circunstâncias ambientais, e a expressão diferencial, em outras. Sob tal hipótese, suas regiões promotoras deveriam apresentar seqüências reconhecidas pelas mesmas proteínas regulatórias, ativadas em condições onde tais genes sejam co-regulados. Em outras situações, entretanto, proteínas regulatórias distintas podem ser ativadas ou produzidas, sendo essas capazes de reconhecer seqüências presentes em apenas um destes genes. Como conseqüência, teríamos a expressão diferencial dos mesmos. Evidências neste sentido têm sido fornecidas por trabalhos realizados por Kim *et al.* (1999) e Kim e Mullet (1995), que revelaram a expressão diferencial de tais genes em resposta à luz. Quanto aos mecanismos de regulação diferencial, trabalhos realizados por Kim e colaboradores identificaram a existência de três regiões regulatórias distintas para o gene *psbD*, evidenciando a possibilidade de reconhecimento por proteínas regulatórias distintas.

Independentemente de entendermos o sistema que regule a expressão dos genes *psbC* e *psbD*, sua expressão diferencial em resposta a estresses por temperatura, além do estresse luminoso revelado por Kim *et al* (1999), demonstra que a existência de diversos aspectos quanto ao papel de tais genes em resposta a estresses ambientais ainda permanecem por ser elucidados.

Juntos, os dados fornecidos pelos estudos de regulação dos genes *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD* demonstram a forte influência ambiental sobre a regulação dos genes do aparelho fotossintético. A resposta diferencial dos mesmos sugere a existência de papéis distintos de cada proteína durante a resposta e a possibilidade de diferentes mecanismos atuarem simultaneamente durante a tentativa de adaptação da planta à condição estressante.

7. CONCLUSÃO

- ⇒ Os níveis de estresse (1 % e 1,7 % de NaCl) impostos às plantas de cana-de-açúcar e o tempo de exposição ao tratamento não causaram a diminuição do rendimento quântico caracterizada pela razão Fv/Fm.
- ⇒ Verificou-se apenas uma pequena alteração no *quenching* fotoquímico de plantas submetidas ao estresse salino.
- ⇒ Análises do *quenching* não fotoquímico e da intensidade da coloração de verde evidenciaram a resposta de cana-de-açúcar à salinidade.
- ⇒ Observou-se que quanto maior a concentração de NaCl e o tempo de exposição ao NaCl, maior o conteúdo de TBARS. No entanto, a cv. CB4789 apresentou níveis de peroxidação maior que a cv. RB72454, mesmo em condições controle.
- ⇒ Os iniciadores desenhados a partir do plastoma de arroz amplificaram de forma eficiente, evidenciando a conservação dessas proteínas, bem como das seqüências gênicas entre as espécies.

- ⇒ Através das análises do perfil de expressão dos genes cloroplásticos *psbA*, *psbB*, *psbC* e *psbD* foi possível verificar que os genes são regulados em resposta aos estímulos impostos.
- ⇒ O gene *psbA* teve sua transcrição reprimida pela salinidade na cultivar RB72454, em contraste com a cv. CB4789, que apresentou aparente indução.
- ⇒ Verificou-se repressão dos genes *psbB*, *psbC* e *psbD* em resposta ao NaCl.
- ⇒ Foi possível observar sutil repressão do gene *psbA* em resposta ao NaCl e ao PEG, em contraste com os genes *psbB*, *psbC* e *psbD*, que apresentaram forte repressão. No entanto, houve aumento do nível de transcritos em resposta ao KCl.
- ⇒ Foi observado indução do gene *psbB* em resposta ao estresse por ferimento, ao contrário dos genes *psbA*, *psbC* e *psbD*, que não foram regulados por tal tratamento.
- ⇒ Observou-se que a alta temperatura teve ação repressora para os genes *psbA*, *psbB* e *psbD*, sendo que o gene *psbC* foi reprimido em resposta à baixa temperatura.
- ⇒ Os genes *psbC* e *psbD* apresentaram ser co-regulados em resposta aos estresses por NaCl, PEG, KCl e Ferimento. Porém, os mesmos genes em resposta à temperatura mostraram ter regulações independentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía, A.; Belkohodja, R.; Morales, F. e Abadía, J. (1999). Effects of salinity on the photosynthetic pigment composition of barley (*Hordeum vulgare* L.) growth under a triple-line-source sprinkler system in the field. *Journal of Plant Physiology* 154: 392-400.
- Adam, Z. (1996). Protein stability and degradation in chloroplasts. *Plant Molecular Biology* 32: 773-783.
- Adams, P.; Thomas, J. C.; Vernon, D. M.; Bohnert, H. J. e Jensen, R. G. (1992). Distinct cellular e organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiology* 33: 1215-1223.
- Al-Janabi, S. M.; Honeycutt, R. J; McClelland, M. e Sobral, B. W. (1993). A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics* 134: 1249-1260.
- Allakhverdiev, S. I.; Sakamoto, A.; Nichiyama, Y.; Inaba, M. e Murata, N. (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiology* 123: 1047-1056.

- Allen J. F. (1993). Redox control of transcription: sensors, response regulators, activators and repressors. *FEBS Letters* 332: 203-207.
- Amtmann, A. e Sanders, D. (1999). Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in botanical research* 29: 76-112.
- Apse, M. P.; Aharon, G. S.; Snedden, W. A., e Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Aro E. M.; Virgin I.; Andersson B. (1993) Photoinhibition of photosystem 11. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 113-134
- Arruda, P. (2001). Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5:2 122-127.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601-639.
- Ayers, R. S. e Wescott, D. W. (1976). Water quality for agriculture. Irrigation and drainage Paper. N° 29. FAO (Roma) 97 pp.
- Azevedo, P. F. (2002). Concorrência no agrobusiness. In: Economia e gestão dos negócios agroalimentares. Editora Pioneira, São Paulo, p.61-79.
- Babani, F. e Lichtenthaler, H. K. (1996). Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *Journal of Plant Physiology* 148: 555-566.
- Baena-González, E.; Baginsky, S.; Mulo, P.; Summer, H.; Aro, E. M. e Link, G. (2001) Chloroplast transcription at different light intensities. Glutathione-mediated phosphorylation of the major RNA polymerase involved in redox-regulated organellar gene expression. *Plant Physiology* 127: 1044-1052.
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P. e Marquardt, J. (1993). Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 212: 297-303.

- Biehler, K. e Fock, H. (1996). Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology* 112: 265-272.
- Blum, A. e Ebercon, A. (1981). Cell membrane stability as measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science* 21: 43-47.
- Blumwald, E.; Aharon, G. S. e Apse, M. P. (1999). Sodium Transport in Plant Cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 :140-151.
- Blumwald, E. (1987) Tonoplast vesicles as a tool in the study of ion-transport at the plant vacuole. *Physiologia Plantarum* 69: 731-734.
- Bohnert, H. J. e Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* 14: 89-97.
- Bohnert, H. J.; Nelson, D. E. e Jensen, R. G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Bolhàr-Nordenkamp, H. R. e Öquist, G. (1993). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall, D., Scurlock, J.M.O.; Bolhàr-Nordenkamp, H.R.; Leegood, C. R. C.; Long, S.P. (eds), Photosynthesis and production in a changing environment, Chapman and Hall, London, p. 193-206.
- Bolhàr-Nordenkamp, H. R.; Long, S. P.; Baker, N. R.; Öquist, G.; Schreiber, U. e Lechner, E. G. (1989). Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3: 497-514.
- Botella, M. A.; Quesada, M. A.; Kononowicz, A. K.; Bressan, R. A.; Pliego, F.; Hasegawa, P. M. e Valpuesta, V. (1994). Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase messenger-RNA. *Plant Molecular Biology* 25: 105-114.
- Bricker, T. M. (1990). The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in Photosystem II. *Photosynthesis Research* 24: 1-13.
- Brown, S. B.; Houghton, J. D. e Hendry, G. A. F. (1991). Chlorophyll breakdown. In: Chlorophylls. Editora H. Scheer, CRC Press, Boca Raton, p. 465-489.

- Brugnoli, E. e Björkman, O. (1992). Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta* 187: 335-345.
- Bruisma, J. (1961). A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochimica et Biophysica Acta* 52: 576-578.
- Burkhead, J. L.; Abdel-Ghany, S. E.; Morrill, J. M.; Pilon-Smits, E. A. e Pilon, M. (2003). The *Arabidopsis thaliana* CUTA gene encodes an evolutionarily conserved copper binding chloroplast protein. *The Plant Journal* 34: 856-867.
- Butler, W. L. e Kitajima, M. (1975). A tripartite model for chloroplast fluorescence. In: Proceedings of the 3rd International congress on Photosynthesis. Editora M. Avron, Elsevier Amsterdam p.13-24.
- Chattopadhyay, M. K.; Tiwari, B. S.; Chattopadhyay, G.; Bose, A.; Sengupta, D. N. e Ghosh, B. (2002). Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 116: 192-199.
- Chen, M.; Choi, Y.; Voytas, D. F. e Rodermel, S. (2000). Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *The Plant Journal* 22: 303-313.
- Christopher, D. A. e Mullet, J. E. (1994). Separate photosensory pathways co-regulate blue light/ultraviolet-A-activated psbD-psbC transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. *Plant Physiology* 104: 1119-1129.
- Christopher, D. A.; Li, X.; Kim, M. e Mullet, J. E. (1997). Involvement of protein kinase and extraplastidic serine/threonine protein phosphatases in signaling pathways regulating plastid transcription and the psbD blue light-responsive promoter in barley. *Plant Physiology* 113: 1273-1282.
- Cohen, I.; Knopf, J. A.; Irihimovitch, V. e Michal Shapira (2005). A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on Rubisco assembly and its subunit expression. *Plant Physiology* 137: 738-746.
- Cushman, J. C. e BohnerT, H. J. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 117-124.

- Da Silva J. A. G.; Sorrels, M. E.; Burnquist, W. L. e Tanksley S. D. (1993). RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36: 782-791.
- Datt, J. F.; Pellinen, R.; Beeckman, T.; van De Cotte, B.; Langebartels, C.; Kangasjervi, J.; Inze, D. e van Breusegem, F. (2003). Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *The Plant Journal* 33: 621-629.
- de Souza Filho, G. A.; Ferreira, B. S.; Dias, J. M. R.; Queiroz, K. S.; Branco, A. T.; Bressan-Smith, R.; Oliveira, J. G. e Garcia, A. B. (2003). Accumulation of SALT protein in rice plants as response to environmental stresses. *Plant Science* 164: 623-628.
- de Vitry, C.; Wollmann F. A. e Delepelaire P (1984) Function of the polypeptides of the Photosystem II reaction center in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 767: 415-422.
- Depege, N.; Bellafiore, S. e Rochaix, J. D. (2003). Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* 299: 1572-1575.
- Devlin, R. M. (1976). Factores que influyen sobre la intensidad de la fotosíntesis. In: *Fisiología Vegetal*. Editora Omega, S.A., Barcelona, 3ª edição, p. 245-259.
- Dhindsa, R. S. e Matowe, W. (1981). Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 32: 79-91.
- D'Hont, A.; Ison, D.; Alix, K.; Roux, C. e Glaszmann, J. C. (1998). Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* 41: 221-225.
- D'Hont, A.; Lu, Y. H.; González de Leon, D.; Grivet, L.; Feldmann, P.; Lanaud, C. e Glaszmann, J. C. (1994). A molecular approach to unraveling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the Andropogoneae tribe. *Genome* 37:222–230.

- Dietz, K. J.; Tavakoli, N.; Kluge, C.; Mimura, T.; Sharma, S. S.; Harris, G. C.; Chardonnens, A. N. e Golldack, D. (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany* 52: 1969-1980.
- Dillewijn, C. van (1952). Botany of sugarcane. Waltham: Chronica Botanica, 371p.
- Döbereiner, J. e Baldini, V. L. D. (1998). Biocombustível: a utilização de combustíveis biológicos ou bioenergéticos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. http://www.biotecnologia.com.br/bio/4hp_5htm
- Dong, Q.; Roy, L.; Freeling, M.; Walbot, V.; Brendel, V. (2003). ZmDB, an integrated database for maize genome research. *Nucleic Acids Research* 31: 244-247.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.
- Durnford, D. G. e Falkowski, P. G. (1997). Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation. *Photosynthesis Research* 53: 229-241.
- El Bissati, K. e Kirilovsky, D. (2002) Regulation of *psbA* and *psaE* expression by light quality in *Synechocystis* species PCC 6803: a redox control mechanism. *Plant Physiology* 125: 1988-2000.
- Fernandes, A. J. (1984). Manual da cana-de-açúcar. Editora Publica, 1ª edição, Piracicaba, p.1-12.
- Fluhr, R. e Chua, N. H. (1986). Developmental regulation of two genes encoding ribulose-bisphosphate carboxylase small subunit in pea and transgenic petunia plants: Phytochrome response and blue-light induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 83: 2358-2362.
- Foyer, C. H. e Noctor, G. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.

- Foyer, C. H. e Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.
- Fulgosi, H.; Vener, A. V.; Altschmied, L.; Herrmann, R. G. e Andersson, B. (1998). A novel multi-functional chloroplast protein: Identification of a 40-kDa immunophilin-like protein located in the thylakoid lumen. *EMBO Journal*. 17: 1577-1587.
- Gabrielsen, E. K. (1948). Effects of different chlorophyll concentrations on photosynthesis in foliage leaves. *Physiologia Plantarum* 1: 5-37.
- Ghanotakis, D. F. e Yocum, C. F. (1990). Photosystem II and the Oxygen-Evolving Complex. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 255-276.
- Gosset, D. R.; Millhollon, E. P.; Lucas, M. C.; Banks, S. W. e Marney, M. M. (1994). The effects of NaCl on antioxidant enzymes activities in callus tissue of salt-tolerant and sensitive cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 13: 498-503.
- Gygi, S. P.; Rist, B. e Aebersold, R. (2000). Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 396-401.
- Ha, S.; Moore, P. H.; Heinz, D.; Kato, S.; Ohmido, N. e Fukui, K. (1999). Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence *in situ* hybridization and imaging methods. *Plant Molecular Biology* 39: 1165-1173.
- Halfter, U.; Ishitani, M. e Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 97: 3735-3740.
- Hankamer B e Barber J. (1997) Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 641-671.

- Hasegawa, P. M.; Bressan, S. A.; Zhu, J. K. e Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Haussuhl, K.; Andersson, B. e Adamska, I. (2001). A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO Journal*. 20: 713-722.
- Havaux, M.; Ernez, M. e Lannoye, R. (1988). Sélection de variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) adaptées à la sécheresse par la mesure de l'extinction de la fluorescence de la chlorophylle in vivo. *Agronomie* 8: 193-199.
- Hendry, G. A. F.; Houghton, J. D. e Brown, S. B. (1987). The degradation of chlorophyll – a biological enigma. *New Phytology* 107: 255-302.
- Hoarau, J. Y.; Offmann, B.; D'Hont, A.; Risterucci, A. M.; Roques, D.; Glaszmann, J. C. e Grivet, L. (2001). Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp). I. Genome mapping with AFLP markers. *Theoretical and applied genetics* 103: 84-97.
- Hoffer, P. H. e Christopher, D. A. (1997). Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast psbD promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 115: 213-22.
- Holzwarth, A. R. (1991). Excited-state kinetics in chlorophyll systems and its relationship to the functional organization of the photosystems. In: Chlorophylls, editora Scheer, H., London, p.1125-1151.
- Ingram, J. e Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403.
- Jajoo, A.; Bharti, S. e Mohanty, P. (2001). Evaluation of the specific roles of anions in electron transport and energy transfer reactions in photosynthesis. *Photosynthetica* 39:3 321-337.

- Jankowiak, R., Hayes, J. M., and Small, G. J. (2002). An Excitonic Pentamer Model for the Core Q_y States of the Isolated Photosystem II Reaction Center. *Journal of Physical Chemistry B* 106: 8803-8814.
- Kaufman, L. S. (1993). Transduction of Blue-Light Signals. *Plant Physiology* 102: 333-337.
- Kawasaki, S.; Kawasaki, Borchert, C.; Deyholos, M.; Wang, H.; Brazille, S.; Kawai, K.; Galbraith, D. e Bohnert, H. J. (2001). Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell* 13: 889-905.
- Kieselbach, T.; Hagman, Å.; Andersson, B. e Schröder, W. P. (1998). The thylakoid lumen of chloroplasts. Isolation and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 6710-6716.
- Kim, M. e Mullet, J. E. (1995). Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light-responsive *psbD-psbC* promoter. *The Plant Cell* 7: 1445-1457.
- Kim, M.; Thum, K. E.; Morishige, D. T. e Mullet, J. E. (1999). Detailed Architecture of the Barley Chloroplast *psbD-psbC* Blue Light-responsive Promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 4684-4692.
- Knight, H.; Trewavas, A. J. e Knight, M. R. (1997). Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal* 12: 1067-1078.
- Krause, G. H, e Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Kusnetsov, V. V.; Mikulovich, T. P.; Kukina, I. M.; Cherepneva, G. N.; Herrmann, R. G. e Kulaeva, O. N. (1993). Changes in the level of chloroplast transcripts in pumpkin cotyledons during heat shock. *FEBS Letters* 26: 189-193.
- Lam, E.; Pontier, D. e del Pozo, O. (1999). Die and let live: programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 502-507.
- Leme Júnior, J. e Borges, J. M. (1965). Açúcar-de-cana. Imprensa Universitária, Viçosa, 328p.

- Lichtenthaler, H.K. e Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society transactions* 11: 591-592.
- Lima, G. A. (1984). Cultura da cana-de-açúcar. Editora Livrocere, 1ª edição, Fortaleza, p.15-35.
- Liu, J. e Zhu, J. K. (1997). An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 14960-14964.
- Liu, J.; Ishitani, M.; Halfter, U.; Kim, C. S. e Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 3730-3734.
- Lu, C. M. e Vonshak, A. (2002). Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiologia Plantarum* 114: 405-413.
- Lu, C.; Qiu, N.; Lu, Q.; Wang, B. e Kuang, T. (2002). Does salt stress lead to increased susceptibility of photosystem II to photoinhibition and changes in photosynthetic pigment composition in halophyte *Suaeda salsa* grown outdoors? *Plant Science* 163: 1063-1068.
- Lu, C.; Qiu, N.; Wang, B. e Zhang, L. (2003). Salinity treatment shows no effect on photosystem II photochemistry, but increases the resistance of photosystem II to heat stress in halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Experimental Botany* 54: 851-860.
- Ma, H.; Schulze, S.; Lee, S.; Yang, M.; Mirkov, E.; Irvine, J.; Moore, P.; Paterson, A. (2003). An EST survey of the sugarcane transcriptome. *Theoretical and applied genetics* 108: 851-863.
- Malhotra, S. D. (1995). In: Biotechnology and sugar cane. 97, 1156p.
- Mathis, P e Paillotin, G. (1981) In: The biochemistry of plants. (eds.) Hatch, M. D.; Boardman, N. K. Academic Press, New York, 97p.

- Maule, R. F.; Mazza, J. A. e Martha Jr., G. B. (2001). Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. *Scientia Agrícola* 58: 295-301.
- Mekkaoui, M. E.; Monneveux, P. e Damania, A. B. (1989). Chlorophyll fluorescence as a predictive test salt tolerance in cereals: preliminary results on durum wheat. *Rachis* 8: 16-19.
- Meloni, D. A.; Oliva, M. A.; Martinez, C. A. e Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49: 69-76.
- Merchant, S. e Sawaya, M. R. (2005). The light reactions: a guide to recent acquisitions for the picture gallery. *The Plant Cell* 17: 648-663.
- Meurer, J.; Plucken, H.; Kowallik, K. V. e Westhoff, P. (1998). A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal* 17: 5286-5297.
- Ming, R.; Liu S. C.; Bowers, J. E.; Moore, P. H.; Irvine, J. E. e Paterson, A. H. (2002). Construction of a *Saccharum* consensus genetic map from two interspecific crosses. *Crop Science* 42: 570-584.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Moller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561-591.
- Monde, R. A.; Greene, J. C. e Stern, D. B. (2000). The sequence and secondary structure of the 3'-UTR affect 3'-end maturation, RNA accumulation, and translation in tobacco chloroplasts. *Plant Molecular Biology* 44: 529-42.
- Monneveux, P.; Mekkaoui, M. E. e Xu, X. (1990). Physiological basis of salt tolerance in wheat. Chlorophyll fluorescence as a new tool for screening tolerant genotypes. In: Wheat Breeding. Prospects and Future Approaches. Varna, Bulgaria, p.1-33.

Monografia Cândido Mendes.

<http://www.geocities.com/consumidor.geo/nivel1/mono.doc>

Morales, F.; Abadia, A.; Gomez-Aparis, J. e Abadia, J. (1992). Effects of combined NaCl and CaCl₂ salinity on photosynthetic parameters of barley grown in nutrient solution. *Physiologia Plantarum* 86: 419-426.

Mudge, J.; Andersen, W. R.; Kehrer, R. L. e Fairbanks, D. J. (1996). A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. *Crop Science* 36:1362-1366.

Nazaenko, L. V. (1992). Effect of sodium chloride on ribulosebiphosphate carboxylase of *Euglena* cells. *Fiziologiya Rastenii* 39: 748-752.

Netto, A. T.; Campostrini, E.; Oliveira, J. G. e Yamanishi, O. K. (2002). Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14: 203-210.

Newton, A. C. e McBeath, C. (1996). The impact of desiccation on chlorophyll fluorescence in detached leaves of six tropical tree species. *Photosynthetica* 32: 491-501.

Ögren, E. e Baker, N. R. (1985) Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. *Plant Cell Environmental* 8: 539-547.

Opanasenko, V.; Semenova, G. e Agafonov, A. (1999). Changes on the structure and functional state of thylakoids under the conditions of the osmotic shock. *Photosynthesis Research* 62: 281-290.

Ort, D. R. e Yocum, C. F. (1996). Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. *Advances in Photosynthesis*, Vol. 4. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.

Ozturk, Z. N.; Talame, V.; Deyholos, M.; Michalowski, C. B.; Galbraith D. W.; Gozukirmizi, N.; Tuberosa, R. e Bohnert, H. J. (2002). Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* 48: 551-573.

- Papageorgiou, G. (1975). Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In: Bioenergetics of Photosynthesis, editora Govindjee, Academic Press, New York, p.319-337.
- Paranhos, S. B. (1987). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Editora Fundação Cargill, volume 1, Campinas, 431p.
- Parida, A. K. e Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Passos, L. (1996). Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal. Embrapa-CNPGL, Coronel Pacheco, 223p.
- Peltier, J. B., Friso, G., Kalume, D. E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I., e van Wijk, K. J. (2000). Proteomics of the chloroplast: Systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins. *The Plant Cell* 12: 319-342.
- Pfannschmidt, T.; Nilsson, A. e Allen, J. F. (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397: 625-628.
- Pfannschmidt, T.; Schutze, K.; Fey, V.; Sherameti, I. e Oelmuller, R. (2003). Chloroplast redox control of nuclear gene expression - a new class of plastid signals in interorganellar communication. *Antioxidants and Redox Signaling* 5: 95-101.
- Pieters, A.J.; Tezara, W. e Herrera, A. (2003). Operation of the xanthophyll cycle and degradation of D1 protein in the inducible CAM plant, *Talinum triangulare*, under water deficit. *Annals of Botany* 92: 393-9.
- Pinazza, L. A. e Alimandro, R. (2001). Os espantosos números do álcool. In: *Agroanalysis*, São Paulo, 21:9 p.11-14.
- Plaut, Z.; Grieve, C. M.; Mass, E. V. (1990). Salinity effects on CO₂ assimilation and diffusive conductance of cowpea leaves. *Physiologia Plantarum* 79: 31-38.
- Prasil, O.; Adir, N. e Ohad, I. (1992). Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery process. In: Barber J, ed. Topics in photosynthesis, the photosystems: structure, function and molecular biology, Vol. 11. Amsterdam: Elsevier, p.220-250.

- Premachandra, G. S., Saneoka, H.; Fujita, K. e Ogata, S. (1992). Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epi-cuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *Journal of Experimental Botany* 43: 1569-1576.
- Qiu, Q.S.; Guo, Y.; Dietrich, M.A.; Schumaker, K.S. e Zhu, J.K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99: 8436-8441.
- Quintero, F.J.; Ohta, M.; Shi, H.; Zhu, J.-K. e Pardo, J.M. (2002). Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99: 9061-9066.
- Rare Books from the MBG Library.
<http://www.illustratedgarden.org/mobot/rarebooks/page.asp?relation=QK99A1K6318831914B2&identifier=0684>
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. (2001). Fotossíntese luz e vida. In: *Biologia Vegetal*, 6ª edição, Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, p.124-151.
- Renger, T. e Marcus, R.A. (2002). *Journal of Physical Chemistry B* 106, 1809-1819.
- Rentel, M. C. e Knight, M. R. (2004). Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 1471-1479.
- Robertson, G.P. (1998) GS⁺: Geostatistics for the environmental sciences. Versão 5.03 Beta, Plainwell, Gamma Design Software, 152p.
- Robinson, S.; Downton, W. J. S. e Millhouse, J. (1983). Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach. *Plant Physiology* 73: 238-242.
- Rus, A.; Yokoi, S.; Sharkhuu, A.; Reddy, M.; Lee, B. H.; Matsumoto, T. K.; Koiwa, H.; Zhu, J. K.; Bressan, R. A. e Hasegawa, P. M. (2001). AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na(+) entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98: 14150-14155.

- Saciloto, R. F. Z. (2003). Inserção do gene *pr5k* em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala*. Piracicaba, 74p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Sakamoto, W.; Tamura, T.; Hanba-Tomita, Y. e Murata, M. (2002). The VAR1 locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes Cells* 7: 769-780.
- Sayre, R. T. e von Wrobelboerner, E. A. (1994) Molecular topology of the photosystem II chlorophyll alpha binding protein, CP43: topology of a thylakoid membrane protein. *Photosynthesis Research* 40: 11-19.
- Scheuermann, R.; Biehler, K.; Stuhlfauth, T. e Fock, H.P. (1991). Simultaneous gas exchange and fluorescence measurements indicate differences in the response of sunflower, bean and maize to water stress. *Photosynthesis Research* 27: 189-197.
- Schreiber, U.; Bilger, W.; Hormann, H. e Neubauer, C. (1998). Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: *Photosynthesis - a Comprehensive Treatise*, editora Raghavendra AS, Cambridge University Press, Cambridge, p.320-336
- Seibert, M. (1993). Biochemical, biophysical, and structural characterization of the isolated photosystem II reaction center complex. In: *The Photosynthetic Reaction Center*, eds. Deisenhofer and Norris, Academic San Diego, p. 319-356.
- Seki, M.; Ishida, J.; Narusaka, M.; Fujita, M.; Nanjo, T.; Umezawa, T.; Kamiya, A.; Nakajima, M.; Enju, A. e Sakurai, T. (2002). Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional & Integrative Genomics* 2: 282-291.
- Seki, M.; Narusaka, M.; Ishida, J.; Nanjo, T.; Fujita, M.; Oono, Y.; Kamiya, A.; Nakajima, M.; Enju, A. e Sakurai, T. (2002). Monitoring the expression profiles of 7,000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31: 279-292.

- Sexton, T. B.; Christopher, D. A. e Mullet, J. E. (1990). Light-induced switch in barley psbD-psbC promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *EMBO Journal* 9: 4485-94.
- Shapira, M.; Lers, A.; Heifetz, P.; Yrihimovitz, V.; Osmond, B. C.; Gillham, N. W. e Boynton, J. E. (1997). Differential regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* during photoacclimation: Light stress suppresses synthesis of the Rubisco LSU protein while enhancing synthesis of the PSII D1 protein. *Plant Molecular Biology* 33: 1001-1011.
- Shikanai, T.; Muller-Moule, P.; Munekage, Y.; Niyogi, K. K. e Pilon, M. (2003). PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *The Plant Cell* 15: 1333-1346.
- Shinozaki, K. e Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiology* 115: 327-334.
- Shof, T.W. e Lium, B.W. (1976). Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulphoxide. *Limnology and oceanography* 21: 926-928.
- Smedema, L. K. e Shiati, K. (2002). Irrigation and salinity: a perspective review of the salinity hazards of irrigation development in the arid zone. *Irrigation and Drainage System* 16: 161-174.
- Smillie, R. M. e Nott, R. (1982). Salt tolerance in crops plants monitored by chlorophyll fluorescence *in vivo*. *Plant Physiology* 70: 1049-1054.
- Smith, S. E.; Johnson, D. W.; Conta, D. M. e Hotchkiss, J. R. (1994). Using climatological, geographical, and taxonomic information to identify sources of mature-plant salt tolerance in alfafa. *Crop Science* 34: 690-694.
- Snyders, S. e Kohorn, B.D. (1999). TAKs, thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. *Journal of Biological Chemistry* 274: 9137-9140.
- Spreitzer R.J. (1993). Genetic dissection of Rubisco structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 1-49.

- Sreenivasan, T. V.; Ahloowalia, B. S. e Heinz, D. J. (1987). Cytogenetics. In: Sugarcane Improvement Through Breeding, editora D.J. Heinz, Elsevier Press, Amsterdam, p.211-253.
- Steffen, R. (2003). Time-resolved spectroscopic investigations of photosystem II. Dissertação de doutorado em química. Universidade Técnica de Berlim, Berlim.
- Strasser, R. J.; Srivatava, A. e Tsimilli-Michael, M. (1999). Screening the Vitality and photosynthetic activity of plants by fluorescence transient. In: Crop Improvement for Food Security (R.K. Behl, M.S. Punia, B.P.S. Lather, eds). SSARM, Hisar, Índia, p.72-115.
- Sugita, M.; e Sugiura, M. (1996). Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Molecular Biology* 32: 315-326.
- Takemura, T.; Hanagata, N.; Sugihara, K.; Baba, S.; Karube, I. e Dubinki, Z. (2000). Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquatic Botany* 68: 15-28.
- Tezara, W.; Martinez, D.; Rengifo, E. e Herrera, A. (2003). Photosynthetic responses of the tropical spiny shrub *Lycium nodosum* (Solanaceae) to drought, soil salinity and saline spray. *Annals of Botany* 92: 757-65.
- Tilley, L. e Chapman, L. (1999). Benchmarking Crop Water Index for the Queensland Sugar Industry. Bureau of Sugar Experiment Stations and Canegrowers, Brisbane.
- Trebitsh, T.; Levitan, A.; Sofer, A. e Danon, A. (2000). Translation of chloroplast psbA mRNA is modulated in the light by counteracting oxidizing and reducing activities. *Molecular and cellular biology* 20: 1116-1123.
- Ueda, A.; Kathiresan, A.; Inada, M.; Narita, Y.; Nakamura, T.; Shi, W.; Takabe, T. e Bennett, J. (2003) Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *Journal of Experimental Botany* 55: 2213-2218.

- Vacha, F.; Durchan, M. e Siffel, P. (2002). Radicals associated with the catalytic intermediates of bovine cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1554: 147-152.
- van Wijk, K. (2000). Proteomics of the chloroplast: Systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *The Plant Cell* 12: 319-341.
- Vasilikiotis, C. e Melis, A. (1994). Photosystem II reaction center damage and repair cycle: chloroplast acclimation strategy to irradiance stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* 91: 7222-7226.
- Vener, A. V.; Ohad, I. e Andersson, B. (1998). Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 217-223.
- Walbot, V. e Cullis, C. A. (1985). Rapid genomic change in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 36: 367-396.
- White, J. A.; Todd, J.; Newman, T.; Focks, N.; Girke, T.; De Ilarduya, O. M.; Jaworski, J.G.; Ohlrogge, J. B. e Benning, C. (2000). A new set of *Arabidopsis thaliana* expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiology* 124: 1582-1594.
- Wohlgemut, H.; Mittlestrass, K.; Kschieschan, S.; Bender, J.; Weigel, H. J.; Overmyer, K.; Kangasjärvi, J.; Sandermann, H. J. e Langebartels, C. (2002). Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell Environmental* 25: 717-726.
- Wollman, F. A.; Minai, L. e Nechushtai, R. (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411: 21-85.
- Yadava, U. L. (1986). A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. *HortScience* 21: 1449-1450.
- Yang, Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Computer applications in the biosciences* 13: 555-556.

- Yanomoto, Y.; Kobayashi, Y. e Matsumoto, H. (2001) Lipid peroxidation is na early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology* 125: 199-208.
- Yoshida, S.; Forno, D. A.; Cock, J. H. e Gomez, K. A. (1987). Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. Los Baños, International Rice Reseach Institute, p.83.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.
- Zhu, J. K.; Shi, J.; Singh, U.; Wyatt, S. E.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. e Capita, N. C. (1993). Enrichment of vitronectin and fibronectin like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. *The Plant Journal* 3: 637-646.
- Zhu, J. K.; Xiong, L.; Ishitani, M.; Liu, J.; Lee, H.; Stevenson, B. e Shi, W. (1998). Identification of genes important for environmental stress tolerance in plants. In *Breeding and Biotechnology of Environmental Stress in Rice*, Y. Sato, ed (Sapporo, Japan: Hokkaido National Agricultural Experiment Station), p.105-113.