

***Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e
Biotecnologia
Trabalho de conclusão de curso**

**FISIOLOGIA E PROTEÔMICA COMPARATIVA DE
DUAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO**

**Autora: Aline Melro Murad
Orientadora: Betânia Ferraz Quirino
Co-Orientador: Octávio Luiz Franco**

**Brasília - DF
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALINE MELRO MURAD

Fisiologia e proteômica comparativa de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino

Dissertação apresentada ao Programa *Stricto sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Orientadora: Dra Betânia Ferraz Quirino

Co-Orientador: Dr Octávio Luiz Franco

**Brasília
2010**

M972f Murad, Aline Melro

Fisiologia e proteômica comparativa de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino. / Aline Melro Murad. – 2010.

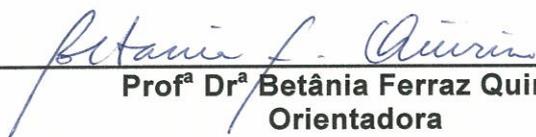
140f.; il.: 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2010.
Orientação: Betânia Ferraz Quirino

Co-Orientação: Octávio Luiz Franco



Dissertação de autoria de Aline Melro Murad, intitulada **Fisiologia e proteômica comparativa de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino**, apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em 26/08/2010, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:



Profª Drª Betânia Ferraz Quirino
Orientadora
Ciências Genômicas e Biotecnologia (UCB)
Embrapa Agroenergia (CNPAE)



Prof Dr. Octávio Luiz Franco
Co-Orientador
Ciências Genômicas e Biotecnologia (UCB)



Profª Drª Beatriz Simas Magalhães
Ciências Genômicas e Biotecnologia (UCB)



Prof. Dr. Enéas Gomes Filho
Universidade Federal do Ceará



Dr. Hugo Bruno-Correa Molinari
EMBRAPA Agroenergia

A todas as pessoas que apoiaram e colaboraram para que este trabalho fosse possível de ser realizado. Dedico

Agradecimentos

Primeiramente a Deus Todo-Poderoso que nos deu a capacidade de raciocinar para termos dúvidas dos acontecimentos de nossa natureza

Aos meus pais, Maria da Conceição Melro da Costa Murad e Jamil Murad pelo carinho, incentivo e é claro, financiamento de meus estudos ao longo de todos estes anos

Ao meu irmão, amigo e conselheiro André Murad que sempre que podia escutava minhas chateações

A minha melhor e mais fiel amiga Adriana Bahia Ferreira por várias horas de diversão e companheirismo ao longo de nossos 18-19 anos de amizade sincera

A minha orientadora prof^a Dr^a Betânia por esta oportunidade maravilhosa que apareceu em um momento muito especial e decisivo de minha vida

A Embrapa Agroenergia (CNPAE) pelo financiamento no início do mestrado

Ao CNPq pela possibilidade de financiamento deste trabalho até a sua conclusão

Ao meu co-orientador Octávio pelas horas de “puxões de orelha”, companheirismo e descontração no laboratório

Ao Dr Hugo Molinari pelas horas dedicadas na casa de vegetação, naquele calor e barulho insuportável e pelas dicas sobre fisiologia

Ao MSc Frederico Takahashi (UnB) pelas dicas sobre o uso do LI-COR e seu manuseio, também na casa de vegetação quente e barulhenta

A Embrapa Cerrados pelo uso de uma de suas casas de vegetações e seus funcionários por “tomarem conta” de nossas plantas

A prof^a Dr^a Beatriz pelas várias horas dedicadas a me ajudar no pólo sul da Embrapa no laboratório de espectrometria durante os fins de semana e nos momentos de sequenciamento *de novo*

A Embrapa-Cenargen e ao Dr Alan Carvalho Andrade pelo uso de suas instalações

Ao Dr Carlos Bloch Jr. pelas horas cedidas para que pudéssemos utilizar o laboratório de espectrometria de massa

As amigas de laboratório Betty, Carol, Michelle, Simone e Suzana pelos almoços legais no *Chilli Peppers* e os Yakisobas no Nipo

A Ângela Tonietto pela ajuda na digestão das proteínas e pelas conversas legais

As amigas Máira Pompeu e a Isabel Cunha pelas conversas super legais e momentos de descontração

Ao Bernardo pelas horas em que me escutou e pelas festas de arromba

Não poderia esquecer também do meu ex-ajudante Nelson Gomes pela excelente mão para confeccionar géis maravilhosos

Aos companheiros do grupo Café com cana pelas horas de diversão e trabalho forçado lavando raízes

A todos do laboratório CAPB que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho tornasse realidade

Enfim.....A todos que me ajudaram em um modo geral, o meu sincero agradecimento.

Muito obrigada!

Resumo

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma importante cultura que vem recebendo atenção mundial por sua importância na produção de açúcar e de bioetanol. A irrigação complementar de culturas alimentícias mostrou ser bastante eficiente principalmente em áreas onde a chuva é escassa. No entanto, uma das suas desvantagens é o acúmulo excessivo de sais no solo. Este é um sério problema de degradação ambiental que causa prejuízos nas culturas. Altas concentrações de sais no solo criam condições fisiológicas semelhantes às aquelas observadas no estresse hídrico. Com o passar do tempo, as taxas de respiração, fotossíntese e crescimento diminuem ocorrendo um quadro de intoxicação pelo acúmulo de íons como Na^+ e Cl^- e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células. A resposta da planta ao estresse salino ocorre em diversos níveis, como celular, fisiológico e molecular, destacando-se a produção de osmólitos compatíveis e de proteínas que respondem ao estresse. Estes compostos possuem a função de regulação da homeostase e proteção de estruturas celulares, induzindo a planta a retomar suas atividades normais. A descoberta de proteínas que respondem ao estresse salino pode ser importante para os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, uma vez que estas proteínas podem aumentar a tolerância ao estresse salino. Dessa forma, o objetivo deste projeto foi comparar as variedades RB867515 e RB855536 submetidas a estresse salino utilizando uma abordagem proteômica. Doze plantas de cada variedade foram cultivadas em potes, sendo que seis plantas de cada variedade foram irrigadas por 48 dias com água destilada para o controle e outras seis plantas foram irrigadas com solução de 100 mM de NaCl. Durante este período, as plantas foram comparadas por meio de análises fisiológicas, bioquímicas e proteômicas. A fluorescência da clorofila a não mostrou diferenças significativas durante o período de tratamento para as duas variedades. As taxas de fotossíntese e o potencial hídrico mostraram diminuição no final do experimento (dia 48) para ambas as variedades. O acúmulo dos nutrientes K^+ , Mg^{2+} , P, Zn e Mn^{2+} ocorreu para a variedade RB855536; para a variedade RB867515, os níveis de Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn aumentaram nas plantas submetidas à salinidade. Os níveis de malondialdeído (MDA) aumentaram nas plantas submetidas a estresse salino das duas variedades no dia 15, evidenciando a ocorrência de peroxidação lipídica nas células. Os valores de acúmulo de prolina nas plantas submetidas a estresse salino foram baixos para a variedade RB855536; mas aumentaram para a variedade RB867515 devido à salinidade.

Para a variedade RB855536 foram sequenciadas 5 proteínas. Duas proteínas *germin-like*, uma ATP sintase CF1 subunidade beta, uma proteína hipotética apresentaram aumento de expressão nas plantas submetidas a estresse salino. Outra proteína hipotética reduziu sua expressão nas plantas submetidas ao estresse salino em relação às plantas do controle. Para a variedade RB867515 foram sequenciadas 13 proteínas com expressão diferenciada entre os tratamentos. Dentre elas, duas proteínas *germin-like* e uma gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aumentaram a expressão em resposta à salinidade. Duas outras proteínas foram encontradas somente em plantas tratadas com sal, a gliceraldeído 3-fosfato e a *heat-shock protein*. A *heat-shock protein* está estritamente relacionada a situações de estresse, sendo assim uma possível candidata para a transformação genética para obtenção de plantas mais resistentes ao estresse salino ou para a sua utilização como biomarcador para o estresse salino em cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, estresse salino, fisiologia, eletroforese bidimensional

Abstract

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is an important crop that has gained worldwide attention for its importance in the production of ethanol and sugar. Irrigation is very effective especially in areas with scarce rain. However, one of its disadvantage is the excessive accumulation of salts in the soil. Saline soils are a serious environmental problem that damages crops. High concentrations of salts in the soil create a physiological condition that is similar to water stress. With time, the rates of respiration, photosynthesis and growth are reduced and severe intoxication occurs due to the accumulation of ions and formation of reactive oxygen species (ROS) in cells. Plant response to salt stress occurs at different levels, such as cellular, physiological and molecular levels, especially the production of compatible osmolytes and proteins that respond to stress. These compounds have a function in keeping homeostasis and protection of cellular structures, so that the plant can resume normal activities. The discovery of proteins that respond to salt stress is important as they can be used as marker of salt stress and in some cases they could be used introduced to sensitive sugarcane varieties to increase tolerance to salt stress. The objective of this project was to compare the varieties RB867515 and RB855536 subjected to salt stress using a proteomic approach. Twelve plants of each variety were grown in pots, and six plants of each variety were irrigated for 48 days with distilled water for the control and six other plants were irrigated with a solution of 100 mM NaCl. During this period, plants were compared through physiological, biochemical and proteomic analysis. Chlorophyll a fluorescence showed no significant differences during the treatment period for both varieties. The rates of photosynthesis and water potential showed a decrease on the 48th day for both varieties. In salt stressed plants, the accumulation of the nutrients K⁺, Mg²⁺, P, Zn and Mn²⁺ in RB855536 occurred; the levels of Mg²⁺, Mn²⁺ and Zn increased in RB867515 in salt stressed plants. The levels of malondialdehyde (MDA) increased in plants under salt stress for both varieties on the 15th day, indicating the occurrence of lipid peroxidation in cells. The values of proline accumulation in plants under salt stress for the variety RB855536 were low and those for the variety RB867515 increased on the 48th day of salt stress. For the variety RB855536 five proteins were sequenced. Two germin-like, an ATP synthase CF1 beta subunit, a hypothetical protein showed an increase in expression in plants under salt stress. Another hypothetical protein reduced its expression in plants grown under salt stress conditions compared to control plants. For the RB867515 variety 13 differentially

expressed proteins were sequenced. Among them, two germin-like proteins and a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase showed increased expression in response to salinity. Two other proteins, glyceraldehyde 3-phosphate and the heat-shock protein were found only in plants treated with salt. The heat-shock protein is strictly related to stress conditions and therefore it is a strong candidate for genetic transformation to obtain plants more resistant to salt stress or for use as a salt stress biomarker in sugarcane.

Keywords: Sugarcane, salt stress, physiology, bidimensional electrophoresis

Lista de Ilustrações

Figura 1: Sistema de numeração de folhas estabelecido por Kuijper.....	22
Figura 2: Complexidade da resposta das plantas aos estresses abióticos.....	28
Figura 3: Esquema de comparação entre os géis bidimensionais das variedades RB855536 e RB867515.....	53
Figura 4: Morfologia das plantas de cana-de-açúcar submetidas a 48 dias de estresse salino.....	56
Figura 5: Aspecto das folhas de cana-de-açúcar submetidas 48 dias de estresse salino após 48 dias.....	57
Figura 6: Variação da taxa de fotossíntese líquida expressa em $\text{mg CO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ durante 48 dias de estresse salino de 100 mM NaCl.....	58
Figura 7: Variação da condutância estomática (g_s) expressa em $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 48 dias de estresse salino de 100 mM NaCl.....	59
Figura 8 Variação do rendimento quântico potencial do fotossistema II (PSII) de folhas de cana-de-açúcar durante 48 dias de tratamento com água ou solução de NaCl 100mM.....	60
Figura 9: Variação do potencial hídrico (expresso em Mega Pascal (MPa) nas folhas de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino (100 mM NaCl) por 48 dias.....	61
Figura 10: Massa seca das partes aérea e raiz da variedade RB855536 de cana-de-açúcar submetida a estresse salino 100 mM por 48 dias.....	62
Figura 11: Massa seca de ambas as partes da variedade RB867515 de cana-de-açúcar submetida a estresse salino 100 mM por 48 dias.....	62
Figura 12: Variação do macronutriente nitrogênio (em $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar.....	63
Figura 13: Variação do macronutriente fósforo (em $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar.....	64
Figura 14: Variação do macronutriente potássio (em $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar.....	64
Figura 15: Variação do macronutriente cálcio (em $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar.....	65
Figura 16: Variação do macronutriente magnésio (em $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar.....	66
Figura 17: Variação do macronutriente enxofre (em $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar das.....	66
Figura 18: Variação do micronutriente alumínio (em $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar.....	67
Figura 19: Variação do micronutriente boro (em $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar das.....	68
Figura 20: Variação do micronutriente cobre (em $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar das.....	68
Figura 21: Variação do micronutriente ferro (em $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar das.....	69
Figura 22: Variação do micronutriente manganês (em $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar.....	70
Figura 23: Variação do micronutriente zinco (em $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) em folhas de cana-de-açúcar das.....	70
Figura 24: Concentração de prolina foliar em cana-de-açúcar ao longo dos 48 dias.....	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 25: Estado da peroxidação lipídica em folhas de cana-de-açúcar ao longo dos 48 dias.....	72
Figura 26: Proteínas foliares totais de cana-de-açúcar corridas em gel de poli(acrilamida (SDS-PAGE 12%).....	73

Figura 27: Gel de poliacrilamida 12 % da variedade de cana-de-açúcar RB867515.....	75
Figura 28: Gel de poliacrilamida 12 % da variedade de cana-de-açúcar RB855536.....	76
Figura 29: Visualização em 3-D das variedades RB867515 planta controle (A) e planta tratada com sal (B) e da variedade RB855536 plantas controle (C) e planta tratada com sal (D).....	77
Figura 30: Gráfico da dispersão obtida da comparação dos géis da variedade RB867515 entre si.....	78
Figura 31: Gráfico de dispersão da correlação dos valores de volume para os géis da variedade RB867515 planta controle e planta tratada com sal.	78
Figura 32: Gráfico da dispersão obtida da comparação dos géis da variedade RB855536 entre si.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 33: Gráfico de dispersão da correlação dos valores de volume para os géis da variedade RB855536 planta controle e planta tratada com sal.	79
Figura 34: Expressão relativa das proteínas identificadas em folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515.....	80
Figura 35: Expressão relativa das proteínas identificadas em folhas de cana-de-açúcar da variedade RB855536.....	81
Figura 36: Gráfico de MS/MS da proteína Frutose 1,6-bifosfato aldolase (s1 ↓) provinda da variedade RB867515.....	129
Figura 37: Gráfico de MS/MS da proteína ATP sintase subunidade α (s2 =) provinda da variedade RB867515.....	130
Figura 38: Gráfico de MS/MS da proteína Ribulose 1,5-Bifosfato carboxilase/oxigenase (s3 =) provinda da variedade RB867515.....	131
Figura 39: Gráfico de MS/MS da proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (s4 ↑) provinda da variedade RB867515.....	132
Figura 40: Gráfico de MS/MS da proteína Frutose 1,6-bifosfato aldolase (s6 =) provinda da variedade RB867515.....	133
Figura 41: Gráfico de MS/MS da proteína Germin-like protein (s8 ↑) provinda da variedade RB867515.....	134
Figura 42: Gráfico de MS/MS da proteína Heat shock proteins 70 (s9 S) provinda da variedade RB867515.....	135
Figura 43: Gráfico de MS/MS da proteína Polipeptídeo de 23 kDa do Fotossistema II (s15 =) provinda da variedade RB867515.....	136
Figura 44: Gráfico de MS/MS da proteína Germin-like protein (s17 =) provinda da variedade RB867515.....	137
Figura 45: Gráfico de MS/MS da proteína ATP sintase subunidade β (s19 ↑) provinda da variedade RB855536.....	138
Figura 46: Gráfico de MS/MS da proteína Germin-like protein (s24 ↑) provinda da variedade RB855536.....	139

Lista de Tabelas

Tabela 1: Proteínas diferencialmente expressas de ambas as variedades tolerante (RB867515) e sensível (RB855536) de cana-de-açúcar após a digestão trípica e análise por MALD-ToF/ToF do dia 48 de estresse salino.....	82
---	----

Lista de abreviações

ROS oxigênio	Espécie reativa de	F_m	Fluorescência máxima
$\bullet O_2^-$	Superóxido	PSII	Fotossistema II
$\bullet OH^-$	Radicais hidroxila	MPa	Mega Pascal
LEA <i>Abundant</i>	<i>Late Embryogenesis</i>	N_2	Nitrogênio líquido
HSP	<i>Heat-Shock Protein</i>	CPAC	Embrapa Cerrados
GB	Glicina-betaína	MF	Massa fresca
ABA	Ácido abscísico	μg	Micrograma
JA	Ácido jasmônico	MDA	Malondialdeído
kDa	Quilo Dalton	TBA	Ácido tiobarbitúrico
mRNA mensageiro	Ácido ribonucléico	TCA	Ácido tricloroacético
RIDESA para o Sucroalcooleiro	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento	nmol	Nanomol
RB	República do Brasil	x g (= RCF)	Força centrífuga relativa
IAC Campinas	Instituto Agrônomo de	SDS	Dodecil sulfato de sódio
CTC Canavieira	Centro de Tecnologia	CHAPS	3-[(3-Cholanidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CV	Canavialis	IPG	Gel de pH imobilizado
2-DE bidimensional	Eletroforese	DTT	Dithiothreitol
EST <i>Tags</i>	<i>Expressed Sequence</i>	IEF	Focalização isoelétrica
SUCEST	<i>Sugarcane EST Project</i>	$v.h^{-1}$	Volt por hora
F_0	Fluorescência inicial	SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio- Gel eletroforético de poliacrilamida
		ACN	Acetonitrila

MALDI-TOF/TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionized Time of Flight/Time of Flight</i>	SOD	Superóxido
		Dismutase	
MS/MS	<i>Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>	Mn-SOD	Superóxido
		dismutase dependente de manganês	
mili-Q	Água ultra pura	POD	Peroxidade
CID	<i>Colision Induced</i>	CAT	Catalase
<i>Dissociaton</i>		GLP	<i>Germin-like</i>
		<i>Protein</i>	
r²	Regressão linear	sHSP	<i>small Heat-shock</i>
#	Número	<i>Protein</i>	
ATP	Adenosina		
trifosfato			

Sumário

Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Ilustrações	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de abreviações	xiv
Sumário	xvi
1. Introdução	18
2. Revisão Bibliográfica	20
2.1. <i>Cana-de-açúcar: da origem à difusão no mundo e nas Américas</i>	20
2.2. <i>A planta de cana-de-açúcar</i>	21
2.3. <i>Cana-de-açúcar: produção e faturamento</i>	22
2.4. <i>Irrigação e estresse salino: a solução de um problema e início de outro</i>	24
2.5. <i>Resposta das plantas ao estresse salino</i>	27
2.6. <i>Melhoramento genético da cultura canavieira</i>	31
2.7. <i>Proteômica do estresse em plantas</i>	33
2.8. <i>The Sugarcane EST Project (SUCEST): Uma iniciativa brasileira</i>	35
2.9. <i>Análises moleculares da resposta da cana-de-açúcar ao estresse</i>	36
2.10. <i>As variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515</i>	38
3. Justificativa	40
4. Hipótese	41
5. Objetivos	42
5.1. <i>Objetivos específicos:</i>	42
6. Material e Métodos	43
6.1. <i>Obtenção e manutenção do material biológico</i>	43
6.2. <i>Medidas da taxa de fotossíntese líquida foliar</i>	43
6.3. <i>Medidas da fluorescência da clorofila a</i>	44
6.4. <i>Medidas do potencial hídrico foliar</i>	44
6.5. <i>Determinação da massa seca da parte aérea e raiz</i>	45
6.6. <i>Quantificação de macro e micronutrientes foliares</i>	45
6.7. <i>Determinação do conteúdo de prolina livre</i>	46
6.8. <i>Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA)</i>	47
7. Análises Estatísticas	47

8. Análises Proteômicas.....	48
8.1. <i>Extração de proteínas foliares totais.....</i>	48
8.2. <i>Análise em eletroforese unidimensional.....</i>	49
8.3. <i>Análises em eletroforese bidimensional (2-DE).....</i>	50
8.4. <i>Visualização dos spots.....</i>	51
8.5. <i>Análise das imagens dos géis bidimensionais.....</i>	51
8.6. <i>Digestão tríplica e dessalinização dos spots selecionados.....</i>	53
8.7. <i>Análises em espectrômetro de massa.....</i>	54
8.8. <i>Identificação de proteínas.....</i>	55
9. Resultados.....	56
9.1. <i>Taxa de fotossíntese líquida foliar e condutância estomática.....</i>	56
9.2. <i>Fluorescência da clorofila a.....</i>	59
9.3. <i>Potencial hídrico foliar total.....</i>	60
9.4. <i>Massa seca total das partes aérea e raiz.....</i>	61
9.5. <i>Macronutrientes e micronutrientes foliares totais.....</i>	63
9.6. <i>Prolina.....</i>	71
9.7. <i>Malondialdeído (MDA).....</i>	72
9.8. <i>Eletroforese Unidimensional.....</i>	72
9.9. <i>Géis Bidimensionais.....</i>	73
Proteínas sequenciadas utilizadas como controle na variedade RB867515.....	85
Proteínas sequenciadas com aumento ou diminuição da expressão na variedade RB867515...	85
Proteínas identificadas na variedade RB855536.....	86
10. Discussão.....	87
Proteínas do metabolismo energético.....	102
Proteínas <i>germin-like</i>	104
Proteínas envolvidas na fotossíntese.....	106
Proteínas produtoras de ATP.....	107
Proteínas Chaperonas.....	107
11. Considerações finais.....	110
12. Referências Bibliográficas.....	112
Anexos.....	128

1. Introdução

No século XX, a palavra cana-de-açúcar foi associada à escravidão e à monocultura. Atualmente, no século XXI, esta cultura começa a estar associada ao combustível renovável, à esperança de redução do efeito estufa e à ecologia. Introduzida no Brasil no início do século XVI, a cultura canavieira encontrou no Brasil um ambiente com clima e temperaturas semelhantes às encontradas na ilha da Madeira, características que foram cruciais para o seu crescimento e desenvolvimento e, por conseguinte, sucesso do cultivo desta cultura no Brasil até os dias atuais (Miranda, 2008).

Assim como para outras culturas alimentícias, como o feijão, a irrigação complementar da cana-de-açúcar demonstra ser, hoje, uma das melhores alternativas tecnológicas em busca do aumento da produção dessa cultura em ambientes com baixo índice pluviométrico, como a região do nordeste brasileiro. No entanto, muitos produtores partem para a irrigação sem um planejamento adequado, sem considerar as necessidades hídricas, o manejo apropriado da água na cultura e sem conhecer as peculiaridades fisiológicas do crescimento das culturas, inclusive da cana-de-açúcar (Farias *et al.*, 2008).

Em muitas regiões do mundo o processo de salinização dos solos por influência antrópica, das águas subterrâneas e superficiais vem se tornando um dos mais importantes problemas de degradação ambiental, social e econômico, pois leva à desertificação, tornando-se inviável a prática agrícola (Figueirêdo, 2005). Esse problema vem crescendo rapidamente, causando perdas na produtividade das culturas agrícolas (Amorim, 2009). Culturas glicótifas, ou seja, plantas que não suportam altas concentrações de salinidade no solo, como o tomate (Blanco e Folegatti, 2008), e o milho (Willadino *et al.*, 1999), ao serem cultivadas em solos com salinidade, apresentam certas características típicas de intoxicação por sais, como diminuição do crescimento de folhas e raízes, clorose, necrose ao longo das folhas das bordas ao centro e morte da planta (Alvin *et al.*, 2001; Verslues *et al.*, 2006; Bosco *et al.*, 2009).

O estresse abiótico desencadeia uma série de respostas nas plantas. Para contornar este problema causado pelo estresse, as plantas se utilizam de ajustes fisiológicos como compartimentalização dos íons tóxicos nos vacúolos, ajuste osmótico e produção de osmólitos compatíveis e, em especial, o aumento de produtos gênicos para a reestruturação da homeostase celular (Verslues *et al.*, 2006).

Tendo isto em vista, muitos dos esforços estão direcionados para prospecção de genes (e seus produtos gênicos) relacionados a vários tipos de estresses por meio da busca de Expressão Sequence Tags (EST's) (Borges *et al.*, 2001). No entanto, os estudos da expressão protéica utilizando ferramentas da proteômica, como a eletroforese bidimensional, em variedades cana-de-açúcar são bastante escassos. Em estudos realizados por Jangpromma *et al.* (2007) os autores demonstraram em variedades contrastantes de cana-de-açúcar uma diferença da expressão protéica entre as variedades submetidas a estresse hídrico. Eles associaram uma proteína de 18 kDa, que aumentou sua expressão nas plantas submetidas ao estresse hídrico. Em estudos mais recentes sobre esta mesma proteína, Jangpromma *et al.*, 2010, discutiram que esta proteína poderia pertencer ao grupo das proteínas hidrofílicas como proteínas Late Embryogenesis Abundant (LEA), deidrinas (proteínas que podem estabilizar estruturas protéicas por meio de funções de chaperonas) assim como proteínas da classe das *heat-shock proteins*. Estes são um dos poucos trabalhos encontrados na literatura onde foi estudado a consequência de um estresse abiótico na cana-de-açúcar.

O presente trabalho é o primeiro estudo sobre o comportamento fisiológico, bioquímico e proteômico das variedades brasileiras de cana-de-açúcar RB867515 e RB855536 sob influência de salinidade no solo. A descoberta de proteínas expressas durante o estresse abiótico (salino, hídrico) é de grande importância para programas de melhoramento genético, uma vez que elas podem ser utilizadas para aumentar a resistência de variedades de cana-de-açúcar sensíveis ao estresse (Alvin *et al.*, 2001) bem como serem utilizadas como biomarcadores para o estresse salino.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Cana-de-açúcar: da origem à difusão no mundo e nas Américas*

Há séculos, a humanidade descobriu o grande potencial de uso da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), uma planta originária da ilha de Papua na Nova Guiné. Posteriormente, por meio das migrações náuticas, foi disseminada em várias ilhas do Pacífico. Em seguida, atingiu o sudeste asiático na Indochina, Malásia, Bengala e China, chegando mais tarde na Índia. Acredita-se que os hindus sabiam extrair o açúcar, assim como fabricar licores alcoólicos a partir do caldo da cana (Miranda, 2008).

Após a invasão dos persas na Índia, no século VI a.C., a cana-de-açúcar foi levada para a Mesopotâmia e a técnica de produção do açúcar foi aperfeiçoada para a forma cristalizada, conhecida atualmente. Em uma batalha, os árabes descobriram a produção açucareira dos persas no ano 637 da era Cristã. Eles implantaram o cultivo da cana com sucesso, por meio de técnicas avançadas da agricultura, em particular a agricultura irrigada, em regiões ao longo do Mar Mediterrâneo. Houve tentativas de implantação da cana em países como a Grécia e França, no entanto sem êxito, devido ao clima. Dessa forma, os orientais foram os maiores fornecedores de açúcar para o ocidente, em especial para a nobreza, por se tratar de uma especiaria rara e valiosa (Miranda, 2008).

O comércio do açúcar para a Europa era feito por vias marítimas. Portugal era passagem obrigatória de naus carregadas de mercadorias devido a sua posição geográfica. Dessa forma, a introdução do cultivo da cana-de-açúcar na ilha da Madeira foi estimulada, por se tratar de um domínio português, onde o clima favoreceu a produção tanto de açúcar como a produção de mudas que foram levadas para as Américas Central e do Sul, principalmente para o Brasil.

As primeiras mudas de cana-de-açúcar do Brasil foram plantadas na capitania de São Vicente, região onde hoje se localiza o estado de São Paulo. Mais tarde, esta cultura foi introduzida em outras capitanias localizadas mais ao nordeste do País, nas regiões da Bahia

ao Pernambuco nos férteis solos de massapé (Miranda, 2008). A cana-de-açúcar encontrou no Brasil um ambiente com clima e temperaturas semelhantes às encontradas na ilha da Madeira, características que foram cruciais para o seu crescimento e desenvolvimento e, por conseguinte, sucesso do cultivo desta cultura no Brasil.

2.2. A planta de cana-de-açúcar

De acordo com a classificação taxonômica, a cana-de-açúcar pertence ao Domínio Eucariota, Reino Plantae, Divisão Magnoliophita (angiospermas), Classe Liliopsida (monocotiledôneas), Ordem Poales, Família Poaceae, gênero *Saccharum*, espécie *Saccharum* spp. A cana-de-açúcar é uma espécie botânica com crescimento do caule em colmos onde podem-se observar os nós e entrenós. Ela possui comportamento alógamo, ou seja, tem fecundação cruzada, entretanto, pode ser propagada vegetativamente por meio dos colmos. A cana-de-açúcar possui um ciclo de vida longo (semi-permanente) podendo chegar até 6 anos (Saciloto, 2003; Borba e Bazzo, 2009). As folhas são numeradas de acordo com o sistema de Kuijper, como foi citado por Van Dillewijn, 1952. A primeira folha de cima para baixo com a bainha vista claramente é designada +1, sendo fotossinteticamente mais ativa. Para baixo elas recebem, sucessivamente, as numerações +2, +3 até terminarem as folhas da planta, conforme ilustrado na Figura 1. Atualmente, as variedades utilizadas para a produção de açúcar e álcool são derivadas do cruzamento entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum* (Saciloto, 2003; Molinari, 2006).

A cana-de-açúcar pode ser utilizada de diversas formas como *in natura* como forragem para alimentação animal e na co-geração de energia elétrica pela queima do bagaço (Borba, 2008). Além disso, a cana-de-açúcar pode ser utilizada como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente e, mais importantemente, álcool e açúcar (Libardi e Cardoso, 2007; Miranda, 2008).

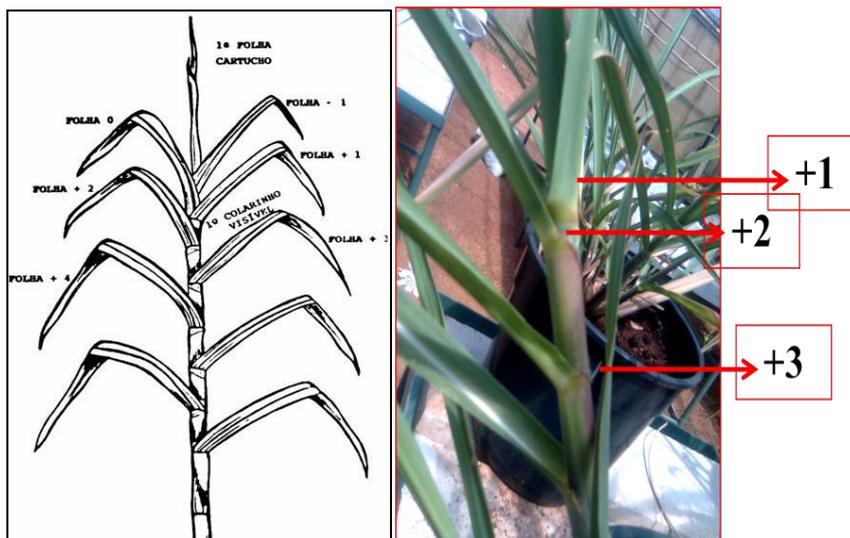


Figura 1: Sistema de numeração de folhas estabelecido por Kuijper. Folhas +1 +2 e +3 são folhas totalmente expandidas e fotossinteticamente ativas (Van Dillewijn, 1952). Foto: Aline Melro Murad.

2.3. Cana-de-açúcar: produção e faturamento

A cana-de-açúcar, após a descoberta de sua potencialidade, se tornou uma das culturas mais importantes no mundo do ponto de vista econômico. Seu cultivo se estende por mais de 80 países tropicais e subtropicais (Molinari *et al.*, 2007). Dentre os principais países produtores de cana-de-açúcar estão o Brasil, atual líder no mercado de produção canieira, seguido da Índia, China, Tailândia e Austrália (Fao, 2009).

No Brasil, a produção canieira se espalha por quase todos os estados do País, o que representa, em números, cerca de 2,8% do território nacional (Conab, 2009). Segundo esse mesmo levantamento, a área destinada ao setor sucroalcooleiro está avaliada em 7.531 mil hectares distribuída em todas as regiões produtoras. No entanto, a produção se concentra na região centro-sul, tendo como principais estados produtores São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Na região nordeste, a produção canieira possui proporções bem menores das encontradas na região centro-sul, sendo que a produção ocorre principalmente nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba. A produção na região norte do País se concentra nos estados do Amazonas, Rondônia e

Pará. Ao se comparar a produção destas três regiões, a região centro-sul participa com cerca de 88,6% da produção nacional, em contraste dos 11,4% das regiões norte-nordeste (Unica, 2008).

De acordo com o terceiro levantamento efetuado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2009) para a safra 2009/2010, um montante estimado de 613.000,00 mil toneladas de cana-de-açúcar deverá ser moído, representando um volume de 7,1% a mais em comparação a safra anterior. O destino final da cana-de-açúcar esmagada (276.000,0 mil toneladas) está dividido entre produção de açúcar (35.000 mil toneladas), representando 45% e a produção de álcool cerca de 336.000,0 mil toneladas (55%), gerando um montante de 26.000,0 bilhões de litros, sendo que 18,21 bilhões de litros serão destinados à fabricação de álcool etílico hidratado e 7.652 bilhões para a produção de álcool anidro.

A utilização do álcool etílico hidratado pode ser dividida entre o teor alcoólico mínimo de 92,6° e o teor 96%. O primeiro é comumente encontrado em bebidas e utilizado na indústria farmacêutica e alcoolquímica. Já o álcool hidratado, com teor alcoólico de 96%, é utilizado em veículos leves bicombustíveis, ou *flex-fuel*. Entretanto, o álcool anidro possui 99,3% de álcool puro e é utilizado como álcool combustível misturado a gasolina (cerca de 20%) aumentando, dessa forma, a octanagem da gasolina (índice de resistência à detonação de combustíveis usados em motores no ciclo de Otto) e melhorando o desempenho de motores a combustão (Santos *et al.*, 2000; Conab, 2009; Vian, 2010).

De acordo com a União da Indústria da cana-de-açúcar (Unica, 2008), o faturamento anual do setor sucroalcooleiro pode alcançar um montante de aproximadamente US\$ 7 bilhões. Já no setor sucroenergético, o Brasil movimentava cerca de US\$ 87 bilhões por ano o que representa cerca de 4,6% do PIB nacional (Molinari, 2006). Além disso, a atividade canavieira no Brasil é responsável por cerca de um milhão de empregos diretos, 511 mil apenas na produção de cana-de-açúcar. O restante está distribuído na agroindústria de açúcar e álcool (UNICA, 2008).

2.4. Irrigação e estresse salino: a solução de um problema e início de outro

A irrigação é uma prática agrícola muito antiga e bastante utilizada no mundo inteiro, principalmente nas regiões tropicais onde predomina o clima quente e seco. Nessas áreas, em que as culturas não dispõem de água suficiente para suprir suas necessidades hídricas durante todo o ciclo vegetativo, a irrigação assume papel de fundamental importância para o sucesso do cultivo das safras agrícolas (Amorim, 2009).

A irrigação sempre figurou como prática essencial ao desenvolvimento humano. Estudos comprovam que em 4.500 a.C. essa prática já era utilizada pelos Assírios, Caldeus e Babilônicos no continente asiático. Da mesma forma, as grandes aglomerações que se fixaram nas margens dos rios Huang Ho e Lang-Tse-Kiang na China (ano 2.000 a.C.), do Nilo, no Egito, do Tigre e do Eufrates, na Mesopotâmia e do Ganges, na Índia (ano 1000 a.C.), nasceram e cresceram graças à utilização eficiente de seus recursos hídricos (Rodrigues e Irias, 2004).

Apesar de possuir benefícios como melhoria no desempenho financeiro de empreendimentos agrícolas e do padrão de vida de comunidades, possibilidade de expansão da fronteira agrícola e favorecer a expansão do mercado de trabalho nos países, a prática da agricultura irrigada pode acarretar prejuízos se aplicada de forma indevida. O processo de salinização dos solos e das águas subterrâneas e superficiais vem se tornando um dos mais importantes problemas de degradação ambiental. Esse problema vem crescendo rapidamente em diversas partes do globo, resultando em quedas na produtividade das culturas agrícolas com o passar do tempo (Amorim, 2009).

De acordo com dados da FAO de 2010, atualmente cerca de 10% a 15% das áreas utilizadas para agricultura irrigada no mundo vem sofrendo com vários níveis de salinidade nos solos. Estima-se que a cada ano ocorram perdas de terras irrigadas com problema de salinidade em torno de 0,5 a 1% (hectare plantado). Para se ter uma dimensão do problema em alguns países pelo mundo, no Paquistão, mais de 25% das áreas irrigadas estão afetadas com salinidade no solo. Na Tunísia e nos EUA, as porcentagens então em torno de 25% e 23%, respectivamente. Na Índia, China e África do Sul, os valores se aproximam de 17%, 15% e 9%, respectivamente. No Brasil, a porcentagem de solos naturalmente afetados com salinidade se aproxima de 10%, ou seja, por volta de 86 milhões de hectares localizados principalmente em áreas secas, onde o índice pluviométrico fica abaixo de 1.000

mm/ano. Estima-se que a área irrigada no Brasil afetada por este problema esteja em torno de aproximadamente 2%, representando 15.000 hectares, grande parte localizada na região nordeste do País (Fao, 2010).

A salinidade causa perdas nas produções agrícolas da ordem de bilhões de dólares todos os anos. Os prejuízos, em dólares, de cultivos em áreas salinizadas estão calculados em US\$ 250/ha, aproximadamente, podendo totalizar US\$ 11 milhões. Relatórios da FAO reportam que em alguns cultivos de algodão, sem nenhum estudo prévio, ocorreu salinização extrema dos solos, a qual induziu a diminuição de 20% na produção, correspondendo a perdas de US\$ 200 milhões/ano (Fao, 2010). Dados da mesma organização reportam a perda também nas produções agrícolas destinadas à alimentação humana de, aproximadamente, US\$ 2 bilhões/ano.

Além da prática da agricultura irrigada, a adição de sais aos solos por influência humana pode acontecer devido à presença de salmouras, resíduos industriais ou por meio de uso excessivo de fertilizantes. Estima-se que dos 20% das terras irrigadas possuindo problemas com salinidade, 10% são de causa antrópica (Fao, 2010). No entanto, a incompatibilidade da irrigação com relação às características físicas, químicas e mineralógicas do solo é apontada como a principal fonte de salinização dos solos. O problema da salinização é agravado principalmente em áreas onde o clima é árido ou semi-árido. Nestas regiões, o baixo índice pluviométrico e as altas taxas de evaporação dificultam o processo de lixiviação dos sais, os quais se acumulam e acabam por agravar o problema da salinidade (Fageria e Gheyi, 1997; Oliveira, 1997).

A qualidade da água, drenagem deficitária, presença de águas subterrâneas ricas em sais hidrossolúveis e a aplicação excessiva de fertilizantes também são citados como agravadores do problema da salinidade. A salinização secundária, como é denominada esse tipo de salinização, segundo alguns autores, pode ser responsável por perdas irreparáveis da capacidade produtiva do solo, tornando improdutíveis grandes extensões de áreas cultivadas (Oliveira, 1997; Dias, 2004). Previsões pessimistas sobre a expansão da salinização dos solos indicam o avanço desse problema e sua ocorrência em 50% das terras agricultáveis no mundo até o ano de 2050 (Wang, Vinocur *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005).

Altas concentrações de sal diminuem o potencial osmótico da solução no solo, criando um quadro de estresse hídrico nas plantas, razão de várias semelhanças entre o estresse hídrico e salino. A absorção da água do solo ocorre quando as forças de extração da água pelos tecidos da raiz das plantas são superiores às forças de retenção da água

exercidas pelo solo. Conforme o potencial da solução do solo diminui, as forças de retenção da água aumentam. No ponto em que as forças de retenção da água são superiores às forças de extração pela planta inicia-se, então, a escassez de água na planta. A presença de sais na solução do solo reduz o potencial da solução e, conseqüentemente, aumenta o problema da escassez da água na planta. Além disso, para evitar a perda de água para o meio ambiente, a planta diminui a taxa de transpiração por meio do fechamento dos estômatos das folhas e aumenta a acumulação de solutos dentro das células (Verslues *et al.*, 2006).

Após o início do estresse hídrico nas plantas, a taxa de crescimento tanto das raízes quanto das folhas começa a diminuir (Hsiao e Xu, 2000). Hu e Schmidhalter, 1998, demonstraram que plantas de trigo diminuiram suas taxas de crescimento em 25% sob estresse salino de 120 mM. Conforme o estresse salino se prolonga por semanas e meses, pode-se observar a redução do tamanho das folhas e raízes, número de brotos, alteração no tempo de floração e redução da produção de sementes (Munns *et al.*, 2000).

Concentrações elevadas de sais ocasionam também um quadro de intoxicação severo na planta (Munns, 2002). Os íons mais frequentes causadores de toxidez são, dentre outros, o cloreto - Cl^- , que causa necrose nas folhas e o sódio - Na^+ , que causa queimadura ou necrose ao longo da borda das folhas. Os efeitos da intoxicação por NaCl são mais visíveis em plantas sensíveis a altas concentrações de sal. Plantas sensíveis submetidas ao estresse salino, em poucos dias, apresentam ferimentos nas folhas mais velhas, como queimadura em suas bordas e clorose (Munns, 2002). Isto ocorre devido a um acúmulo em níveis excessivos de Na^+ e/ou Cl^- nas folhas, excedendo a capacidade das células em compartimentalizar esses íons nos vacúolos. O aumento das concentrações dos íons no citoplasma interfere na atividade de enzimas e no metabolismo da célula em geral, como processos de fotossíntese e respiração, concentração de açúcares e metabolismo de proteínas (Neto *et al.*, 2004; Takahashi e Murata, 2008). Grandes quantidades desses íons podem também danificar membranas plasmáticas. A célula começa a diminuir de tamanho, a concentração interna da célula aumenta e a célula rapidamente começa a desidratar. Ao longo do estresse, as células passam a morrer e as folhas apresentam um quadro de clorose. A planta aparenta uma seca fisiológica acompanhando a diminuição da taxa de crescimento e produção (Munns, 2002). Além disso, as interações do sal com outros íons e minerais podem resultar em um desbalanço e deficiências nutricionais (Lange *et al.*, 2005; Neves *et al.*, 2008; Bosco *et al.*, 2009), redução do crescimento e os danos moleculares causados pelas interações negativas do sal podem acarretar, nos casos mais severos, na morte da planta (Tunçturk *et al.*, 2008).

Diversos autores relatam a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em consequência do estresse salino (Reddy *et al.*, 2004; Vinocur e Altman, 2005). O estresse oxidativo ocorre quando o elemento oxigênio torna-se quimicamente ativado por processos químicos ou físicos. Na ativação física do oxigênio ocorre a transferência da energia de excitação de um elétron do pigmento foto-ativado, tal como a molécula de clorofila. Essa energia é altamente difusível e possui a capacidade de reagir com outras moléculas orgânicas, o que pode acarretar em danos nas membranas do aparelho fotossintético (Noctor e Foyer, 1998). Já a ativação química ocorre por meio de processos onde são formados íons superóxidos ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$), os quais são altamente reativos. Todas as espécies reativas de oxigênio podem reagir com DNA, proteínas e lipídeos e são biologicamente tóxicos. As espécies reativas de oxigênio (ROS) colidem com moléculas orgânicas e extraem um elétron destas. Desta forma, o radical se propaga pela célula em uma reação em cadeia, gerando outras espécies reativas de oxigênio. As diferentes formas de ROS causam diversos danos nas células vegetais como: inibição de enzimas sensíveis, degradação da clorofila, peroxidação lipídica, entre outros (Richter e Schweizer, 1997).

2.5. Resposta das plantas ao estresse salino

Estresses ambientais, tais como déficit hídrico, temperaturas extremas, estresse oxidativo e salinidade estão frequentemente interconectados e podem induzir danos celulares semelhantes. Como consequência, esses vários estresses abióticos usualmente ativam vias de sinalização celulares análogas além de respostas celulares.

As respostas ao estresse abiótico não ocorrem de forma linear, mas sim de forma integrada em um circuito envolvendo diversas vias, compartimentos específicos da célula, tecidos e a interação de co-fatores adicionais e/ou moléculas sinalizadoras para coordenar a resposta específica dada pelo estímulo (Dombrowski, 2003). Neste caso, as respostas das plantas ao estresse ocorrem tanto em nível celular e molecular como em nível fisiológico. A transdução do sinal do estresse abiótico ocorre via sinalizadores que podem ser divididos em três grandes grupos: (I) sinalizadores de estresse osmótico/oxidativo que utilizam

moduladores de *Mitogen-Activated Protein kinase* (MAPK), envolvendo a produção de enzimas e componentes anti-oxidantes assim como a produção de metabólitos compatíveis (compostos presentes em grandes quantidades capazes de contribuir para a homeostase celular sem interferir com o metabolismo); (II) sinalizadores Ca^{2+} -dependentes, iniciando a ativação de genes de proteínas do tipo LEA, *Heat Shock Proteins* (HSPs) e chaperonas, envolvidos na produção de proteínas que respondem ao estresse e são protetoras de membranas e proteínas e; (III) sinalizadores *Salt Overlay Sensitive* (SOS) dependentes de Ca^{2+} que regulam a absorção de água, homeostase de íons e o transporte destes via aquaporinas e transportadores de íons (Wang, Scali *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2005). Estes processos são fundamentais para a re-estabilização da homeostase celular assim como para a reparação, proteção estrutural e funcional de membranas plasmáticas e proteínas. Respostas ineficientes, em qualquer um dos níveis de resposta, podem acarretar em mudanças na homeostase, destruição de proteínas funcionais e estruturais de maneira irreversível, acarretando a morte celular e, em casos mais severos, morte da planta (Figura 2).

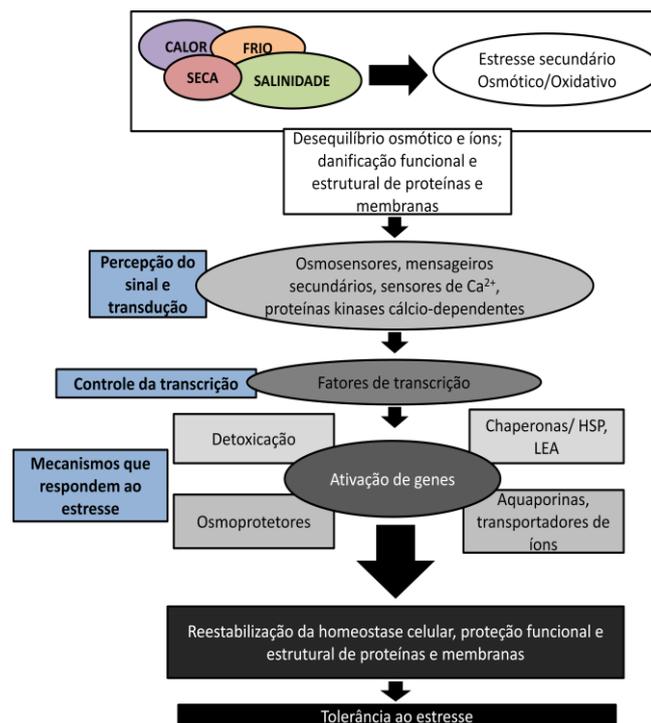


Figura 2: Complexidade da resposta das plantas aos estresses abióticos. Estresses abióticos estão frequentemente interconectados e produzem danos celulares e estresses secundários que são percebidos por sensores de estresse, ativam os controladores de transcrição, nos quais ativam os mecanismos que respondem ao estresse para re-estabilização homeostática e proteção celular. A falha da resposta em qualquer nível de resposta pode acarretar mudanças na homeostase da célula, destruição de proteínas funcionais e estruturais levando a morte celular (Wang, Vinocur *et al.*, 2003, com adaptações).

A produção de metabólitos compatíveis ou osmólitos compatíveis inicia-se como resposta da planta ao estresse osmótico. Aparentemente, essas moléculas não interferem com os processos metabólicos da célula e a presença de metabólitos compatíveis nas células possui um papel importante na conservação da pressão osmótica do citoplasma. Dessa forma os mesmos contribuem para a manutenção da absorção de água e pressão de turgor da célula, ajudando a manter as funções fisiológicas e bioquímicas da planta. Estes compostos são compartimentalizados no interior da célula, diminuindo a pressão osmótica no interior celular em vários tecidos da planta. A diminuição da pressão osmótica induz a translocação da água do meio extracelular para o meio intracelular, assim como a continuação da absorção de água pelas raízes. Além disso, a produção de osmólitos compatíveis pode funcionar como proteção funcional e estrutural de proteínas e outros componentes celulares durante o estresse (Sahi *et al.*, 2006).

Existem diferentes tipos de metabólitos compatíveis, podendo ser divididos em: (I) aminoácidos e seus derivados; (II) açúcares e (III) alcoóis (Sakamoto e Murata, 2000; Sahi *et al.*, 2006). Essas pequenas moléculas podem possuir algumas características que as tornam capazes de atuar durante o estresse acarretando reestabelecimento da célula e seus componentes. Dentre essas características estão a alta solubilidade em água, polaridade e a presença de uma grande área de solvatação, permitindo o acúmulo de moléculas de água e, dessa forma, mantendo em funcionamento todos os processos celulares. Um dos metabólitos compatíveis mais citados por estar relacionado com a presença de estresse em plantas é o aminoácido prolina (Sairam e Tyagi, 2004; Molinari, 2006).

A L-prolina é um dos 20 aminoácidos presente nas proteínas de todos os organismos vivos. Em plantas, este aminoácido é sintetizado a partir do glutamato via Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) pelas enzimas P5C sintetase (P5CS) ou P5C redutase (P5CR) (Lutts *et al.*, 1999). Alternativamente, pode ser produzido a partir da ortinina pela enzima ortinina δ -aminotransferase – OAT (Roosens *et al.*, 2002). Em condições de estresse hídrico, o aminoácido prolina é produzido e acumulado no citoplasma das células, resultando em um decréscimo no potencial osmótico. Essa redução no potencial osmótico favorece a manutenção da absorção de água e a pressão de turgor em todos os tecidos da planta. Isto contribui para a contínua absorção de água pelas raízes, manutenção do funcionamento dos processos de fotossíntese, abertura estomática para trocas gasosas e crescimento e desenvolvimento da planta. Além disso, a prolina tem sido relatada como um removedor de diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS), além de protetor de membranas celulares e proteínas contra os efeitos adversos de altas concentrações de íons inorgânicos e inibidor da agregação de proteínas (Tsugane *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999).

Além do aminoácido prolina, compostos contendo amônia quartenária também são amplamente conhecidos por promoverem a manutenção dos processos celulares em plantas. De todas as amônias quartenárias conhecidas, a glicina-betaína (GB) ocorre em mais abundância em resposta ao déficit hídrico (Ashraf e Foolad, 2007). Diversos estudos revelaram a acumulação desse composto em muitas culturas, principalmente em genótipos tolerantes, dentre eles beterraba, espinafre e algumas variedades de grãos tais como cevada, aveia e sorgo (Weimberg *et al.*, 1984; Fallon e Phillips, 1989; Mccue e Hanson, 1990; Rhodes e Hanson, 1993; Yang *et al.*, 2003). Em plantas superiores, a GB é sintetizada nos cloroplastos via serina etanolamina, clorina e betaína aldeído. A clorina é convertida à betaína aldeído pela enzima clorina mono-oxigenase, a qual, por sua vez, é convertida a GB pela desidrogenase da betaína aldeído (Hanson e Scott, 1980; Rhodes e Hanson, 1993). A GB é mais abundante principalmente nos cloroplastos, onde sua atuação é indispensável para o ajustamento e proteção das membranas dos tilacóides, mantendo, dessa forma, a eficiência do aparato fotossintético (Robinson e Jones, 1986; Genard *et al.*, 1991).

Algumas culturas, devido a uma melhor adaptação osmótica, conseguem sobreviver satisfatoriamente perante ambientes salinos. Essa capacidade adaptativa é importante para seleção de culturas mais tolerantes que são capazes de produzir rendimentos economicamente viáveis em áreas onde outras culturas não são capazes de se desenvolverem devido à presença de solos salinos. Em primeira instância, um dos mecanismos de tolerância existentes nestas plantas, a nível fisiológico, é o ajuste osmótico, o qual contribui para o acúmulo de solutos na célula resultando em uma diminuição do potencial hídrico, sem afetar o metabolismo no citoplasma da célula. De acordo com Taiz e Zeiger, 2004, esse ajustamento pode ocorrer desde a raiz até as folhas e em diferentes intensidades, envolvendo a absorção e a acumulação de íons inorgânicos, além da síntese de íons orgânicos. Neste caso, a alteração da concentração de osmólitos compatíveis pode induzir a ativação de genes relacionados ao estresse, funcionando como sinais primários. Evidências indicam que genes que respondem ao estresse hídrico ou salino estão sob uma regulação complexa (Munns, 2005).

A percepção do estresse abiótico desencadeia a indução de genes de estresse que podem ser do tipo: 1) genes reguladores da expressão gênica e transdução de sinais ou; 2) genes que protegem a planta contra o estresse. Os genes reguladores incluem fatores de transcrição, exercendo um papel fundamental na resposta ao estresse salino. Dentre eles estão as vias do ácido abscísico (ABA) e do ácido jasmônico (JA). A via ABA pode requerer a síntese de certas proteínas para ativarem fatores de transcrição ou essas vias por si

regulam a transcrição de genes e, conseqüentemente, a expressão gênica de proteínas envolvidas na resistência à salinidade (Sairam e Tyagi, 2004; Molinari, 2006).

O segundo tipo se refere à proteínas que funcionam na proteção das células da planta contra a desidratação, assim como enzimas envolvidas na biossíntese de osmoprotetores, enzimas detoxificantes, entre outros (Molinari *et al.*, 2004). Moons *et al.*, 1997, demonstraram em seus experimentos com arroz o aumento de certos tipos de mRNAs durante a exposição das plantas ao estresse. Esses mRNAs codificavam uma proteína de 29 kDa e duas de 40 kDa as quais tiveram sua expressão aumentada em exposição inicial ao estresse salino e gradualmente decaiu com a prolongada exposição ao sal. Ao expor as plantas a patógenos não foi observada nenhuma alteração da expressão desses mRNAs especificamente, indicando uma alteração específica da abundância destes mRNAs provocada pelo estresse.

2.6. Melhoramento genético da cultura canavieira

O sucesso da implantação do cultivo da cana-de-açúcar no Brasil deve-se a alguns fatores, dentre eles, o ambiente com clima, temperaturas e solos adequados ao seu desenvolvimento e também graças à utilização de cultivares adaptados obtidos por meio de melhoramento genético. Neste contexto, atualmente existem quatro empresas no ramo de produção de variedades, sendo duas públicas e duas privadas: a RIDESA – Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucrialcooleiro, responsável pelas variedades com a sigla RB – República do Brasil, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC – SP), atuando no Estado de São Paulo Melo, 2005 e mais recentemente a Monsanto que comprou as empresas brasileiras Alellyx e a empresa do grupo Votorantim, a CANAVIALIS (CV).

Apesar de ser uma alternativa, a obtenção de variedades de cana-de-açúcar elite pelo processo de melhoramento clássico demonstra ser um processo relativamente demorado. Os híbridos provindos do cruzamento de *S. officinarum* (clones nobres), *S. sinense* (clones chineses), *S. barberi* (clones do norte da Índia) e *S. spontaneum* (clone selvagem) são poliplóides ou aneuplóides, portando, tendo em média cerca de 100-120

cromossomos, com um tamanho estimado de células somáticas de 10,000 Mpb (D'Hont, 2005). Dentro das cultivares comerciais, o número de cromossomos pode variar, sendo que a média do genoma básico varia de 760 a 926 Mpb, o qual é duas vezes maior que o genoma do arroz (389 Mpb) e similar ao do sorgo (760 Mpb) (D'hont e Glaszman, 2001). Essa complexidade da cana-de-açúcar dificulta o desenvolvimento de cultivares biotecnologicamente modificada.

Plantas transgênicas resistentes à diversos patógenos e herbicidas já foram relatadas (Alexander *et al.*, 1993; Monquero, 2005; Aragao e Faria, 2009), mas estão distantes de serem comercializadas. Questões de propriedade intelectual, problemas de regulação e falta de conhecimento sobre quais genes controlam as funções de interesse comercial nas plantas são entraves na produção e comercialização de plantas transgênicas. Sendo assim, a descoberta de genes e a identificação de suas funções são essenciais para programas de melhoramento genético e programas de produção de marcadores assistidos em cana-de-açúcar (Menossi *et al.*, 2008).

Alguns estudos conseguiram com sucesso a transformação genética da cana-de-açúcar. Enríquez-Obregón *et al.*, 1997 inicialmente descreveram a utilização de *Agrobacterium tumefaciens* para a transformação genética da cana-de-açúcar. Bower e Birch, 1992, descreveram pela primeira vez a transformação genética da cana-de-açúcar pelo método da biobalística que atualmente ainda é o método mais utilizado para obtenção de cana-de-açúcar transgênica.

Alguns resultados práticos reforçam a importância da utilização da engenharia genética como uma alternativa para a obtenção de novas variedades desta espécie. Ingelbrecht *et al.*, 1999 e Falco *et al.*, 2000 obtiveram plantas de cana-de-açúcar resistentes à herbicida e ao vírus-do-mosáico, respectivamente, por meio de bombardeamento de calos embriogênicos. Molinari (2006) obteve, por meio da mesma técnica, plantas de cana-de-açúcar transgênicas tolerantes ao déficit hídrico utilizando o gene *P5CS que codifica a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase*, uma enzima pertencente à via metabólica de biossíntese da prolina, um aminoácido comumente conhecido por estar relacionado com tolerância a vários tipos de estresses abióticos. Esses resultados demonstram que a transformação genética da cana-de-açúcar é uma técnica viável para a incorporação de genes de interesse biotecnológico no intuito de converter uma variedade sensível em tolerante a determinado estresse.

2.7. *Proteômica do estresse em plantas*

A resposta das plantas ao estresse salino ocorre em vários níveis moleculares, iniciando com a percepção do sinal, passando pela ativação de genes específicos para o estresse e finalizando com a produção de compostos capazes de proteger a célula contra os adventos do estresse (Zhu, 2001; Sairam e Tyagi, 2004.) Dentre esses compostos produzidos se encontram as proteínas. Dessa forma, o estudo do proteoma em plantas torna-se valioso para a descoberta de novas proteínas de defesa contra o estresse.

A proteômica é o estudo global das proteínas de um determinado organismo. Em uma visão mais recente do conceito, a proteômica visa comparar o padrão de proteínas de um tecido em uma determinada circunstância, como por exemplo, um estresse biótico ou abiótico (Wilkins *et al.*, 1996; Salekdeh *et al.*, 2002a). Para tanto, a identificação destas proteínas específicas envolvidas em uma possível resistência ao estresse salino dá-se pela utilização de ferramentas da área proteômica como a eletroforese unidimensional e a eletroforese bidimensional. No entanto, a eletroforese unidimensional fornece um estudo mais restrito de um material biológico, pois as proteínas são separadas somente por sua massa molecular. Já a eletroforese bidimensional fornece um panorama mais abrangente do conteúdo de uma amostra protéica, pois além das proteínas serem separadas por sua massa molecular, também são separadas por seu ponto isoelétrico (pI), tornando a eletroforese bidimensional, embora laboriosa, uma técnica simples mais ao mesmo tempo refinada para o estudo de proteomas comparativos (Graves e Haystead, 2002).

Mudanças na expressão gênica a níveis transcricionais e pós-transcricionais foram demonstrados inicialmente pela análise do perfil protéico de plantas de tabaco submetidas ao estresse salino. Ericson e Alfinito, 1984, estudaram culturas de células de tabaco submetidas a estresse salino em meio líquido contendo 10 g.L^{-1} de NaCl por 12 dias, obtendo um decréscimo do crescimento celular no tratamento salino, em comparação ao controle. Também observaram uma alteração na expressão de proteínas. Certas proteínas, analisadas em géis unidimensionais, de massa molecular de 20 kDa e 32 kDa aumentaram sua concentração e, em géis 2-DE, proteínas de 26 kDa que apareceram no tratamento salino não foram encontradas em géis controles, indicando uma modificação do padrão de expressão protéica sob condições de estresse.

Hurkman *et al* (1991) trabalhando com cevada crescida hidroponicamente com 200 mM de NaCl por seis dias obtiveram duas proteínas de 26 kDa, em pIs de 6,3 e 6,5. Essas

proteínas se assemelharam a proteína *germin*, uma glicoproteína específica de monocotiledôneas com resistência à ação de proteases relacionada com a liberação de Ca^{+2} , um mensageiro secundário.

Moons *et al.* (1997), trabalhando com raízes de semente de arroz crescidas em meio contendo 150 mM de NaCl por 9 dias verificaram um acúmulo de certos tipos de mRNA em resposta ao estresse e estes codificaram para proteínas de 29 kDa, 39 kDa e 40 kDa. Estes estudos mostraram mudanças tanto quantitativas quanto qualitativas no padrão de polipeptídios sintetizados logo após tratamentos salinos e relacionaram o aumento destas proteínas com possível atividade de osmoregulação das células. Yan *et al.* (2005), em seus trabalhos com raiz de arroz utilizando 150 mM de NaCl, encontraram dez proteínas diferencialmente expressas em resposta ao estresse salino, entre elas estão a triosefosfato isomerase, a enolase e a peroxidase, todas envolvidas em vários processos tais como o metabolismo de carboidratos, do nitrogênio e de proteínas envolvidas em detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Outras seis são UGPase, COX6b-1 e proteínas putativas, novas enzimas descritas relacionadas com a resposta ao estresse salino.

Caruso *et al.* (2008) submetendo plantas de trigo à estresse salino de 100 mM de NaCl por dois dias detectaram, em géis 2-DE de folhas, 38 proteínas envolvidas em processos de regulação do metabolismo de carboidratos, manutenção da homeostase iônica, proteínas envolvidas em remoção de ROS, como ascorbato peroxidase. Eles identificaram também uma glutamina sintetase, enzima possivelmente relacionada com a síntese do aminoácido prolina, usualmente relacionada com tolerância de plantas a estresses abióticos.

Outras proteínas induzidas por sal foram também identificadas em géis 2-DE em raízes de arroz, incluindo proteínas do grupo LEA. Proteínas LEA, induzidas pelo hormônio ABA, formam um grupo de proteínas associadas à tolerância a dessecação durante a maturação de sementes, mas também induzidas por estresses hídrico e salino. Essas proteínas possuem características próprias conforme suas funções. Além disso, outros trabalhos descrevem a produção de inibidores de proteases e *heat-shock proteins* (HSP) em resposta ao estresse salino em plantas de arroz (Borkird *et al.*, 1991; Bostock e Quatrano, 1992; Sairam e Tyagi, 2004).

2.8. *The Sugarcane EST Project (SUCEST): Uma iniciativa brasileira*

Devido a importância da cana-de-açúcar para o País, também na área de genômica tem havido investimentos para banco de dados e determinar função de genes nesta espécie. O principal objetivo do SUCEST é realizar um programa de EST em grande escala por sequenciamento aleatório de clones de bibliotecas de cDNA preparados a partir de vários tecidos de cana (calos, raiz, caule, folhas estioladas, flores, sementes em desenvolvimento, entre outros) (Sucest-Fun, 2010).

Sendo uma iniciativa brasileira e financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Cooperativa de cana-de-açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (Copersucar) e a Central de Álcool Lucélia, o Projeto SUCEST-FUN visa associar a função dos genes identificados pelo Sugarcane EST Project (SUCEST) por meio da transcriptoma da cana-de-açúcar (Sucest-Fun, 2010).

O projeto visa estudar a regulação da expressão gênica e gerar ferramentas que permitam empregar uma abordagem de Biologia de sistemas para cana-de-açúcar para identificar redes de regulação. Genes de interesse são avaliados funcionalmente através da geração de transgênicos alterados para sua expressão. O banco de dados SUCEST-FUN irá integrar as sequências do SUCEST, promotores, os dados de expressão, características agrônômicas, fisiológicas e caracterização bioquímica de cultivares de cana, fornecendo dados importantes sobre uma das culturas economicamente mais importantes para o Brasil (Sucest-Fun, 2010).

2.9. Análises moleculares da resposta da cana-de-açúcar ao estresse

Em relação à cana-de-açúcar, muitos esforços estão direcionados para prospecção de genes relacionados a vários tipos de estresses. Uma das principais abordagens utilizadas para a busca destes genes de interesse está na utilização de *expressed sequence tags* ou simplesmente EST's. Borges *et al.* (2001) com o intuito de identificar genes que codificam chaperonas moleculares usando a comparação homóloga entre as sequências de EST's de cana-de-açúcar do banco de dados do *Sugarcane Expressed Sequence Tags* (SUCEST) (www.sucest-fun.org/) relataram, com bases em estudos de bioinformática que quase 2% (cerca de 4.164 EST's) das sequências depositadas equivaliam ou eram associadas a chaperonas, algumas da família das *heat shock proteins*, proteínas comumente relacionadas ao enovelamento de proteínas recentemente sintetizadas (Hartl, 1996) ou até em situações de estresse (Mayer e Bukau, 2005).

Vettore *et al.*, 2003 adquiriram cerca de 237 mil EST's de cana-de-açúcar de diferentes órgãos e tecidos em vários estádios de desenvolvimento, utilizando o banco de dados de EST's do *Sugarcane EST's program*, o SUCEST, verificaram que quase 50% das sequências foram associadas com proteínas putativas incluindo proteínas de metabolismo, comunicação/sinalização e proteínas que respondem ao estresse.

Embora as sequências depositadas no banco de dados do SUCEST facilitem a descoberta de genes/proteínas relacionadas ao estresse abiótico em plantas em culturas como a da cana-de-açúcar, deve-se levar em consideração que um número substancial de proteínas pode ter uma pequena correlação entre nível de expressão de mRNA e nível de expressão da respectiva proteína. No mais, as funções das proteínas podem depender consideravelmente de modificações pós-traducionais e interação com outras proteínas, processos os quais não podem ser deduzidos por meio do genoma ou por estudos baseados em expressão de mRNA. Dessa forma, a análise direta de proteínas torna-se a melhor abordagem para a identificação das funções dos genes, principalmente quando comparando diferentes situações (Dublely e Grover, 2001).

Jangpromma *et al.* (2007) submeteram duas variedades contrastantes de cana-de-açúcar a estresse hídrico por três semanas as quais foram monitoradas por meio de testes de potencial hídrico. Fisiologicamente, a variedade tolerante demonstrou um comportamento

semelhante entre as plantas estressadas e controle e, na variedade sensível, as plantas estressadas diminuiram o seu potencial hídrico, indicando uma interferência do estresse hídrico na planta. Do ponto de vista proteômico foi observado uma mudança na expressão de proteínas em ambas as variedades. Na variedade sensível, 104 proteínas demonstraram uma resposta ao estresse hídrico. Destas, 30 estavam presentes somente nas plantas estressadas, 42 aumentaram sua expressão e 32 diminuíram a expressão. Na tolerante, 128 proteínas demonstraram uma resposta ao estresse hídrico, onde 54 foram observadas somente nas plantas estressadas, 46 aumentaram a expressão e 28 diminuíram. Uma proteína de 18 kDa (não identificada) aumentou intensamente sua expressão nas plantas tolerantes e diminuiu nas plantas estressadas visualizado por meio de 2-DE e *Western Blot*, a qual, de acordo com os autores, pode ser uma forte candidata para a produção de biomarcadores para esse estresse nesta cultura.

Em um trabalho mais recente, Jangpromma *et al.* (2010) sequenciaram a proteína de 18 kDa (chamada de p18) e esta mostrou homologia com a proteína hipotética Osl_014484 de arroz. Estudos posteriores desta proteína utilizando o programa TagIdent (www.expasy.org), que realiza uma busca no banco de dados de proteínas do UniProtKB/Swiss-Prot utilizando a massa molecular e o pI da proteína, revelaram uma lista de 37 proteínas com massas e pI próximos aos da proteína p18. Dentre elas, três grupos foram encontrados também em resultados de sequenciamento de proteínas por *Peptide Mass Fingerprint: Heat-Shock Protein* classe I, deidrina Rab18, e proteína LEA D-7. Os autores, neste mesmo trabalho, produziram anticorpos para esta proteína, os quais poderão ser utilizados para detecção de proteínas biomarcadoras de estresse hídrico em cana-de-açúcar. Estes dois trabalhos estão entre os poucos relacionando estresse abiótico em cana-de-açúcar, fisiologia e proteômica utilizando eletroforese bidimensional.

A maioria dos estudos sobre a expressão de proteínas induzidas por estresses abióticos tem sido conduzidos principalmente em plantas como cevada (Sule *et al.*, 2004; Witzel *et al.*, 2009), trigo (Caruso *et al.*, 2008) e em plantas modelo como o arroz (Salekdeh *et al.*, 2002b; Abbasi e Komatsu, 2004; Dooki *et al.*, 2006), cujo genoma já está sequenciado. Existem poucas informações sobre o padrão de proteínas expressas em cana-de-açúcar durante estresses abióticos, principalmente para o estresse salino. Dessa forma, tornam-se necessários estudos mais aprofundados sobre o padrão de proteínas expressas em variedades brasileiras de cana-de-açúcar, visto que a proteômica é uma técnica que pode identificar proteínas com potencial biotecnológico como biomarcadoras de estresse salino e para a transformação genética desta variedade visando tolerância ao estresse salino.

2.10. As variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515

Segundo o Censo Varietal 2007 divulgado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), atualmente as variedades RB (República do Brasil) ocupam mais de 50% dos canaviais do País. De acordo com este censo, as variedades RB855536 e RB867515 ocupam o 2º e o 4º lugar, respectivamente, na escolha dos produtores e esta escolha varia principalmente pelo desempenho da cana-de-açúcar apresentada no campo (Coplana, 2007).

A variedade RB855536 foi gerada a partir do cruzamento das variedades SP701143 e a RB72-454. Como aspectos gerais, esta variedade possui um touceiramento bom com touceiras semi-abertas, colmos eretos e empalhados, com bainhas semi-abertas, de fácil despalha, diâmetro médio e de cor verde arroxeadada. Dentre os destaques estão a alta produtividade agroindustrial e ótima brotação de soqueira, mesmo sob palha; porte ereto, de fácil colheita e ausência de florescimento. Outros destaques são a resistência a doenças como a ferrugem, o carvão e ao mosaico da cana-de-açúcar. No entanto, esta variedade exige ser plantada em ambientes favoráveis com boa disponibilidade de água, pois não tolera seca (Hoffmann *et al.*, 2008).

Já a variedade RB867515 foi gerada a partir da variedade RB72-454 com genitor desconhecido. Alta velocidade de crescimento, porte alto, hábito de crescimento ereto, alta densidade de colmo de cor verde arroxeadado que se acentua quando expostos e fácil despalha são alguns dos aspectos gerais da variedade. Possui boa resistência à doenças fúngicas, como a ferrugem e o carvão e ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar. Esta variedade, diferentemente da RB855536, deve ser plantada em ambientes menos favoráveis para evitar a formação de estrias vermelhas ao longo das folhas. Os melhores destaques desta variedade são boa brotação de soqueira, alto teor de sacarose e de produtividade e a tolerância à seca (Hoffmann *et al.*, 2008).

As características das variedades RB855536 e RB867515 de sensibilidade ou tolerância a seca são meramente empíricas, ou seja, existem apenas relatos de observações dos produtores de cana-de-açúcar. Não existem estudos científicos fisiológicos ou proteômicos para comprovar essa observação. Sendo assim, a utilização das variedades RB855536 e RB867515 possuindo diferentes genótipos e fenótipos de sensibilidade e tolerância à seca em estudos de salinidade nos solos tornam-se importantes, uma vez que o

estresse hídrico e o estresse salino desencadeiam respostas fisiológicas e moleculares iniciais de forma similar.

3. Justificativa

Atualmente a cultura da cana-de-açúcar se espalha por mais de 80 países tropicais, sendo que o Brasil se estabeleceu na posição de maior produtor mundial. Por ano, o processamento da cana-de-açúcar gera lucro de cerca de 40 bilhões de reais para o setor sucroalcooleiro. Além da produção de açúcar cristalizado, a partir da cana-de-açúcar se produz o etanol, um biocombustível limpo e renovável. Isto ressalta a importância desta cultura para o Brasil, não somente pela geração do lucro, mas também pela importância ambiental como potencial substituto para os derivados de petróleo e social pela geração de empregos no meio rural gerando riquezas e divisas. Apesar da lucratividade dessa cultura, estresses abióticos, em especial o estresse salino, podem induzir um impacto negativo para o setor. Muitos dos esforços para a descoberta de genes que respondem ao estresse estão baseados na utilização de EST's.

Trabalhos utilizando uma abordagem proteômica para estudo de como estresses afetam a cana-de-açúcar, em especial o estresse salino, são escassos. Análises fisiológicas fornecem informações valiosas sobre o funcionamento das plantas e, juntamente com a proteômica que fornece informações como modificações pós-transcricionais e interações com outras proteínas. Estes processos não podem ser deduzidos por meio de genoma ou mRNA.

Dessa maneira, justificam-se estudos proteômicos da cana-de-açúcar, em especial a comparação da expressão protéica em variedades de cana-de-açúcar brasileiras submetidas ao estresse salino. Sendo assim, a identificação de proteínas que respondem ao estresse salino podem levar, futuramente, ao desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar tolerantes a esse estresse abiótico por meio de transformação genética.

Além disso, as variedades RB ocupam 50% das plantas cultivadas atualmente no Brasil e as variedades RB855536 e RB867515 estão entre as primeiras na escolha dos produtores. Possuindo características como alta produtividade, alto teor de sacarose e sensibilidade ou tolerância à seca, estas variedades proporcionarão a compreensão do comportamento fisiológico e proteômico de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidos à estresse salino.

4. Hipótese

Plantas sensíveis (RB855536) ou tolerantes (RB867515) a estresse hídrico podem se comportar semelhante em condições de estresse salino, podendo ser sensíveis ou tolerantes ao estresse, respectivamente

5. Objetivos

Fazer uma análise fisiológica, bioquímica e proteômica foliar comparativa com duas variedades de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino de 100 mM de NaCl ou tratadas com água.

5.1. *Objetivos específicos:*

- Caracterizar parâmetros fisiológicos como fotossíntese líquida, fluorescência da clorofila a e potencial hídrico foliar de duas variedades de cana-de-açúcar (RB855536 e RB867515) de plantas controle tratadas com água e plantas submetidas a estresse salino de 100 mM.
- Fazer uma análise comparativa das proteínas foliares das duas variedades utilizando géis bidimensionais e identificar proteínas diferencialmente expressas, por meio de MALDI-TOF/TOF, nas variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515 em plantas controle tratadas com água e submetidas a estresse salino de 100 mM de NaCl aos 48 dias de estresse.
- Realizar análises bioquímicas comparativas da composição de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (Cu, Fe, Zn, Mn, B, Al) nas variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515 ao longo do tempo em plantas controle tratadas com água e em plantas submetidas a estresse salino de 100 mM por 48 dias.

6. Material e Métodos

6.1. *Obtenção e manutenção do material biológico*

Duas variedades de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) (RB855536 e RB867515) foram obtidas da RIDESA. Os colmos das duas variedades de cana-de-açúcar foram cultivados em vermiculita por um mês em casa telada a 30°C. Após esse período, as plantas crescidas foram separadas em pequenos colmos contendo um broto crescido e transplantadas para vasos definitivos furados no fundo número 5 com 25 cm de diâmetro, contendo terra, adubo, areia, em uma proporção equilibrada de 4:2:1, calcário e fertilizante NPK (10:10:10) sendo regadas diariamente até atingirem a idade de 4 meses.

Após esse período, as plantas foram submetidas ao estresse salino. O delineamento experimental consistiu na utilização de 6 (seis) repetições de cada variedade de cana (sensível e tolerante à seca de acordo com os produtores de cana-de-açúcar Hoffmann *et al.*, 2008) sendo: 1) Seis plantas de cada variedade (RB867515 e RB855536) como tratamento controle, irrigadas somente com água destilada e; 2) seis plantas de cada variedade como tratamento teste, irrigadas com solução de 100 mM NaCl (nível de salinidade leve-moderado) diariamente. Os vasos foram mantidos em casa telada a 30°C dispostos de forma aleatória e ambos os tratamentos foram irrigados até a sua capacidade de campo (\pm 700 mL) por um período de 48 dias.

6.2. *Medidas da taxa de fotossíntese líquida foliar*

A determinação da taxa fotossintética líquida total das folhas das variedades RB867515 e RB855536 de cana-de-açúcar foi realizada no período da manhã no horário

entre 8 e 10 horas e logo após a irrigação dos vasos com H₂O destilada ou solução salina 100 mM de NaCl. As taxas de fotossíntese líquida total (mg.CO₂. dm⁻².h⁻¹) foram realizadas em condições naturais. O terço médio das folhas +1 de cada repetição foi acoplado no sensor de quantum, evitando-se a nervura central, e as taxas fotossintéticas foram obtidas utilizando um sistema portátil de fotossíntese, modelo LICOR-6400 (LI-COR, Lincon, NE, EUA) de acordo com o manual do fabricante. Foram realizadas medidas nos dias 0, 10, 15 e 48 após o início do estresse salino.

6.3. *Medidas da fluorescência da clorofila a*

As variáveis da fluorescência da clorofila *a* foram determinadas em condições naturais no período da manhã entre os horários de 10 e 11 horas. As medidas foram feitas após o pré-condicionamento no escuro, por uma hora, para garantir o estado oxidado dos centros de reação fotossintéticos, com o auxílio de pinças de metal (DLC-8) colocadas na região mediana das folhas +1, em um dos lados do limbo foliar, evitando-se a nervura central. A fluorescência da clorofila *a* foi realizada com o auxílio do fluorímetro portátil de luz modulada MINI-PAM (Waltz, Effeltrich, Alemanha), a partir do qual foram obtidos a fluorescência inicial (F_0), a fluorescência máxima (F_m) e o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m). As medidas foram feitas nos dias 0, 10, 15 e 48 após o início do estresse salino.

6.4. *Medidas do potencial hídrico foliar*

Após as medidas de fotossíntese líquida e fluorescência da clorofila *a*, as folhas +1 foram removidas das plantas de cana-de-açúcar com auxílio de estilete e introduzidas na câmara de pressão do tipo Scholander (Scholander *et al.*, 1964). Uma pressão de 0,2 em

0,2 MPa foi aplicada, por meio da introdução de gás nitrogênio, no interior da câmara de Scholander até a seiva do xilema tornar-se visível na superfície cortada da lâmina foliar. A pressão, em Mega Pascal (MPa), necessária para que a seiva do xilema retorne à superfície cortada da lâmina foliar foi considerada como potencial hídrico total do xilema. As medidas de potencial hídrico foram realizadas nos dias 0, 10, 15 e 48 após o início do estresse salino.

6.5. *Determinação da massa seca da parte aérea e raiz*

Ao final do experimento, aos 48 dias do início dos tratamentos e após a obtenção dos dados de fotossíntese líquida total e fluorescência da clorofila *a*, a parte aérea e as raízes das seis plantas do tratamento controle, irrigados com água destilada (RB855536 e RB867515), e a seis plantas do tratamento, irrigadas com solução salina de NaCl 100 mM (RB855536 e RB867515) foram separadas para a determinação da massa seca total. O material, em sacos de papel devidamente identificados, foi seco em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 80 °C e pesados diariamente utilizando uma balança eletrônica com precisão de 0,001 g (Marte) até atingirem massa constante.

6.6. *Quantificação de macro e micronutrientes foliares*

Para as análises de macro e micro nutrientes, cerca de 1 mg de tecido foliar (folha +1) das seis plantas das duas variedades do tratamento controle e salino previamente pulverizados em N₂ líquido foram colocados em estufa a 65 °C por 72 horas. As concentrações dos nutrientes (N, P, K, Mg, S, Al, B, Cu, Fe, Mn e Zn) foram determinadas no Laboratório de Química Analítica da Embrapa Cerrados (CPAC) por meio da técnica de

espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado, em espectrômetro modelo Thermo Jarrell Ash IRIS/AP® e o nitrogênio por meio de colorimetria pelo método de semimicro Kjeldahl (Nogueira, 2005).

6.7. Determinação do conteúdo de prolina livre

As análises de prolina livre nas folhas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Bates *et al.*, 1973. Inicialmente foi feita uma curva padrão utilizando prolina a 100 mg/L. Em seguida, 100 mg de tecido foliar previamente macerado foi homogeneizado em 5 mL de ácido sulfossalicílico 3% utilizando um vórtex. Em seguida esse material foi centrifugado por 10 minutos a 16.100 x g. Após a centrifugação, 2 mL do sobrenadante material foi coletado e transferido para um novo tubo no qual foram adicionados 2 mL níhídrica ácida (140 mM de níhidrina, 60 % de ácido acético, 6 M ácido fosfórico). A mistura foi agitada com um vórtex e fervida em banho-maria a 100°C por 1 hora, sendo a reação parada pela imersão dos tubos em banho de gelo por 10 minutos. Posteriormente foram acrescentadas 4 mL de tolueno, sendo os tubos agitados vórtex por 20 segundos. Aguardou-se a completa separação das duas fases e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm utilizando a fase superior (tolueno).

Os equivalentes de prolina livre foram calculados por meio da seguinte expressão:

$$\mu\text{mol de prolina.gMF}^{-1} = [(\mu\text{g prolina/mL} \times \text{mL tolueno} / 115,1 \mu\text{g}/\mu\text{mol})] / [(g \text{ de amostra} / 2,5)]$$

6.8. Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA)

O malondialdeído (MDA) das folhas foi feito de acordo com a metodologia descrita por Hodges *et al.*, 1999. Cerca de 100 mg de tecido foliar previamente macerado foi homogeneizado em 6,5 mL de etanol 80% (v/v) e em seguida a solução foi centrifugada a 16.100 x g por 10 min. Desse extrato foi coletado 1 mL, transferiu-se esse líquido para outro tubo de microcentrífuga de 15 mL contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,65% (p/v) em ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). As amostras foram incubadas a 95°C durante 25 minutos, transferidas para o gelo por dez minutos e centrifugadas novamente para realizar leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 532 nm e 600 nm.

Os equivalentes de MDA expressos em nanomol de MDA por grama de massa fresca (nmol.g MF⁻¹) foram calculados através da seguinte expressão:

$$\text{Equivalentes MDA (nmol.g MF}^{-1}\text{)} = [(A_{532} - A_{600}) / 155000] \times 10^6$$

7. Análises Estatísticas

A análise de variância dos dados obtidos foi realizada utilizando o programa BioEstat versão 5.0. Os dados com variância significativa ($P \leq 0,05$) tiveram suas médias comparadas executando o Teste t de Student do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá.

(<http://www.mamiraua.org.br/download/index.php?dirpath=./BioEstat%205%20Portugues&order=0>)

8. Análises Proteômicas

8.1. *Extração de proteínas foliares totais*

Para as análises proteômicas foram escolhidas as folhas +1 e +2 de plantas com 48 dias de estresse salino. Ambas as folhas do dia 48 do controle e do tratamento salino das duas variedades foram coletadas, congeladas e pulverizadas em nitrogênio líquido com a ajuda de um almofariz e pistilo.

Um *pool* de amostras das variedades RB855536 e RB867515 de ambos os tratamentos foi feito, consistindo, assim, em réplicas técnicas. As proteínas totais das folhas de cana-de-açúcar, em seguida, foram extraídas utilizando o protocolo de Wang, Scali *et al.*, 2003, modificado. Cerca de 10 gramas de folhas previamente pulverizadas em nitrogênio líquido foram homogenizadas, com ajuda de um vórtex, em 25 mL de acetona 100% gelada. O material então foi submetido à centrifugação a 23.500 x g, 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e esta etapa repetida três vezes. Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em 10 mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona 100% gelada, centrifugado a 23.500 x g, a 4 °C por 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o processo repetido três vezes. Logo após, o precipitado foi colocado em suspensão em 10 mL de uma solução contendo TCA 10% em água destilada gelada. A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 23.500 x g a 4 °C, o sobrenadante descartado e o procedimento repetido três vezes. Por último, o precipitado foi lavado com 10 mL de acetona 80% gelada três vezes, sendo cada etapa de lavagem seguida de centrifugações a 23.500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, sendo adicionado ao precipitado 10 mL de fenol tamponado com Tris pH \pm 7.9 (Sigma-Aldrich) e 10 mL de tampão de solubilização contendo sacarose 30% (m/v), SDS 2% (m/v), Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) e β -mercaptoetanol 5% (v/v). A solução foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex, centrifugada a 23.500 x g a 4 °C por 5 minutos. A fase fenólica foi coletada e transferida para outro tubo limpo e acrescida de mais 10 mL de fenol tamponado e 10 mL de tampão de solubilização para a eliminação de interferentes como açúcares e compostos fenólicos. A fase fenólica foi novamente coletada e as proteínas foram precipitadas utilizando uma solução contendo acetato de amônio 0,1 M em metanol absoluto gelado *overnight* a -80 °C. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 23.500 x g por 5 minutos a 4 °C, sendo o

sobrenadante desprezado. O sedimento formado foi lavado utilizando a solução de acetato de amônio 0,1 M em metanol gelado, centrifugado a 23.500 x g a 4 °C por 5 minutos por duas vezes, descartou-se o sobrenadante e logo em seguida o precipitado foi lavado com acetona 100% gelada, também por duas vezes e centrifugado a 4 °C, 23.500 x g por 5 minutos. Desprezando o sobrenadante, o material foi colocado em temperatura ambiente para a completa evaporação da acetona e as proteínas foram solubilizadas em um tampão de ressuspensão contendo SDS 2% (m/v), glicerol 5% (v/v), Tris HCl 0,05 M pH 6,8.

8.2. Análise em eletroforese unidimensional

A eficiência do protocolo de extração com fenol foi verificada em SDS-PAGE, conforme descrito por Laemmli, 1970. Vinte e cinco microgramas de proteínas foram precipitadas utilizando uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 75% para uma concentração final da solução de TCA de 10% por um período de 1 h em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16.100 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado lavado três vezes com acetona absoluta gelada (-20 °C) e centrifugado por 15 minutos a 16.100 x g. A quantificação foi realizada pelo método de Lowry *et al.*, 1951, utilizando o kit *RC DC Protein Assay* (BioRad, Berkeley CA, EUA). Utilizou-se o marcador *Unstained Protein Molecular Marker* (Fermentas, Canadá) com as seguintes massas e proteínas referentes: 116 kDa (β -galactosidade), 66,2 kDa (albumina serina bovina), 45 kDa (ovalbumina), 35 kDa (lactato desidrogenase), 25 kDa (REase Bsp981), 18,4 kDa (β -lactoglobulina) e 14,4 kDa (lisozima).

8.3. Análises em eletroforese bidimensional (2-DE)

Setecentos microgramas de proteínas totais foram precipitadas utilizando uma solução de TCA (concentração final do TCA de 10%) por um período de 1h em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16.100 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado três vezes com acetona absoluta gelada (-20°C) e centrifugado por 15 minutos a 16.100 x g a 4 °C e, após a evaporação da acetona, as amostras foram solubilizadas no tampão de hidratação contendo uréia 8 M, CHAPS 2%, IPG buffer 0,5% e traço de azul de bromofenol adicionado de 32,5 µL 1 M dithiothreitol (DTT) (molaridade final da solução de DTT de 65 mM). Em seguida, as amostras foram aquecidas a uma temperatura de 50°C por 10 minutos. As amostras foram então colocadas em sulcos da cama para hidratação juntamente com as *Strips* de pH imobilizado (IPG - *immobilized pH gel* GE Healthcare) de pl não-linear de 3 a 11 por um período de 16 horas a 20 °C de acordo com o manual de instruções do fabricante.

As *strips* hidratadas foram colocadas para a focalização isoeletrica (IEF) utilizando o equipamento Ettan™ IPGphor™ 3 (GE Healthcare). Os parâmetros usados para a focalização consistiram de quatro etapas: 1) 30 minutos, 500 V, 2 mA, 5 W; 2) 30 minutos, 1000 V, 2 mA, 5 W; 3) 1h 30 minutos, 3500 V, 2 mA, 5W; 4) 5h 30 minutos, 3500 V, 2 mA, 5 W, acumulando 53.250 v·h⁻¹. Após a focalização isoeletrica, as *strips* foram conservadas em freezer -80 °C para a eletroforese bidimensional (segunda dimensão).

As *strips* focalizadas foram equilibradas com soluções de DTT (Tris-HCl 50 mM pH 8,8, Uréia 6 M, Glicerol 30%, SDS 2%, DTT 1% e traço de azul de bromofenol) por 15 minutos. Em seguida, a solução foi trocada pela solução de iodoacetamida (Tris-HCl 50 mM pH 8,8, Ureia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, iodoacetamida 1% e traço de azul de bromofenol) por 15 minutos. Para a segunda dimensão, utilizou-se a cuba de eletroforese para seis géis Ettan™ DALTsix (GE Healthcare). As *strips* focalizadas e equilibradas foram lavadas com tampão de corrida contendo Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), glicina 192 mM, SDS 10%. Em seguida foram colocadas no topo do gel SDS-PAGE 12%, conforme descrito por Laemmli (1970) e isoladas com solução selante contendo Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, agarose 0,5% e traço de azul de bromofenol. Os parâmetros para a corrida da segunda dimensão consistiram de duas fases, sendo a primeira por 30 minutos a 600 V., 90 mA, 100 W e a segunda fase por 8 horas a 700 V, 240 mA, 100 W. A corrida foi interrompida quando o azul de bromofenol atingiu o final do gel. Como marcador molecular utilizou-se o

BenchMark preinstained protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) com as massas de 180 kDa, 115 kDa, 82 kDa, 64 kDa, 49 kDa, 37 kDa, 26 kDa, 19 kDa, 15 kDa, 6 kDa.

8.4. Visualização das proteínas

Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em recipientes contendo solução de fixação (ácido acético 10%, metanol 40% e água destilada 50%) *overnight*. Em seguida, a solução foi descartada e substituída por uma solução de azul brilhante de Coomassie G-250 (Coomassie Blue G-250 0,1%, ácido fosfórico 2%, sulfato de amônio 10% e metanol 20%) *overnight* para a visualização das proteínas (Neuhoff *et al.*, 1988; Kang *et al.*, 2002), com modificações.

8.5. Análise das imagens dos géis bidimensionais

As imagens dos géis bidimensionais foram digitalizadas usando o scanner HP Scanjet 8290 no modo fotografia. Estas posteriormente foram analisadas utilizando o programa BioNumerics 5.10 (Applied Maths, Bélgica). Os géis da variedade RB855536 de cana-de-açúcar aos 48 dias de estresse salino foram comparados da seguinte forma: os *spots* das triplicatas dos géis controle da variedade foram comparados entre si, assim como os *spots* das triplicatas dos géis da plantas tratadas com sal. Em seguida, os géis das plantas controle e os géis das plantas tratadas com sal foram comparados entre si para verificar a diferença de proteínas expressas, de acordo com a Figura 3. A mesma comparação descrita acima foi realizada para a variedade RB867515. Um total de 12 géis montados (seis géis para cada variedade, sendo 3 controle tratadas com água e 3 de plantas tratadas com sal) foram comparados somente intervariedades, ou seja, somente entre os géis da mesma variedade.

Para a comparação dos géis utilizando o programa BioNumerics, as imagens de todos os géis foram previamente padronizadas, onde determinou-se a escala de cinza, formato TIFF com OD de 8 bits com o intuito de minimizar distorções na análise dos géis. A detecção dos *spots* foi realizada com subtração do fundo e detecção automáticos seguida de correções manuais (contraste do *spot* de 47%, separação de *spots* de 75%, tamanho do *spot* de 25 pixels e tamanho mínimo do *spot* de 3 pixels).

Para a normalização dos géis, foi efetuada a criação de um gel de referência a partir de *spots* determinados nos géis analisados, determinação da métrica dos géis a fim de que a análise siga os padrões determinados pelos marcadores de massa molecular (Y), ponto isoelétrico (x) e intensidade (z) de alguns *spots*. Depois de normalizados, os *spots* dos géis foram ligados aos *spots* do gel de referência previamente criado por meio de “*landmarks*”. Devido à corrida eletroforética SDS-PAGE apresentar uma dependência logarítmica entre o pI e a massa, por conta das *strips* utilizadas no trabalho serem de pI não-lineares, foi utilizado um ajuste de 2 graus para a massa molecular. Os demais valores permaneceram de acordo com os padrões do *software*.

Nas comparações, os géis tiveram seus *spots* iguais ligados entre si e identificados numericamente e, em seguida, os valores de volume gerados pelo programa para cada *spot* foram usados para os cálculos de correlação. Foram realizadas todas as comparações possíveis com os valores de volume de cada tratamento. O gel que possuiu o coeficiente de correlação que mais se assemelhava entre os outros dois géis foi escolhido para a comparação com o gel do outro tratamento. Os valores de volume relativo foram utilizados para a seleção de *spots* diferenciais com aumento ou diminuição da expressão de pelo menos duas vezes ou ausência e presença de *spot*.

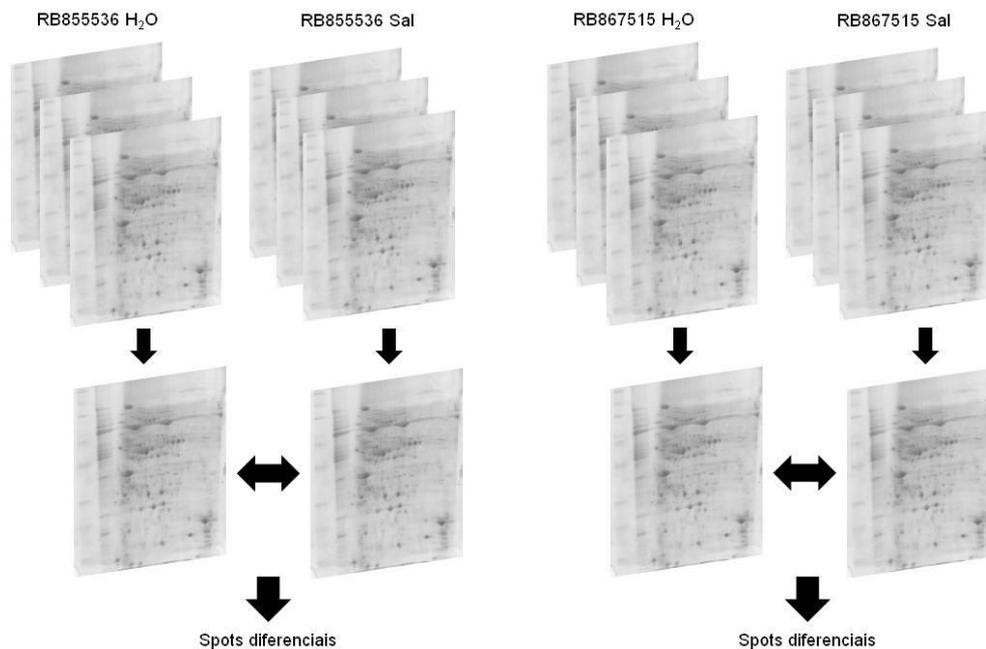


Figura 3: Esquema de comparação entre os géis bidimensionais das variedades RB855536 e RB867515

8.6. *Digestão triptica e dessalinização das proteínas selecionadas*

Após as análises dos *spots* utilizando o *software* BioNumerics, as proteínas diferenciais foram retirados dos 3 géis com a ajuda de ponteiros P-1000 e colocados em tubos para microcentrífuga de 1,5 mL devidamente identificados (*pool* das proteínas). Para a tripsinização das proteínas separadas, foi utilizado o protocolo descrito previamente por Shevchenko *et al.*, 1996; Shevchenko *et al.*, 2007, com modificações, sendo todas as soluções preparadas no dia da execução do procedimento. Após a excisão dos *spots* dos géis de poliacrilamida, os pedaços de géis foram colocados em tubos para microcentrífuga contendo solução descorante (50% H₂O destilada, 40% de metanol absoluto e 10 % de ácido acético) *overnight*. Após esse período, a solução foi descartada e os pedaços de *spots* foram lavados com etanol 50% três vezes, aguardando 15 minutos entre cada lavagem. Desprezando a solução de etanol, foram acrescentados aos *spots* 300 µL de acetonitrila (ACN) 100% até os *spots* apresentarem uma coloração branca opaca. Em seguida, a solução de ACN foi descartada e acrescentaram-se 50 µL de 100 mM de bicarbonato de amônio

contendo 10 mM de DTT (concentração final). Os tubos foram colocados em banho-maria a 56 °C por meia hora. Após esse período, a solução foi retirada, adicionou-se uma solução de 100 mM de bicarbonato de amônio com 55 mM de iodoacetamida e os tubos contendo essa solução foram colocados à temperatura ambiente, no escuro por 1h 30min. Desprezando a solução, os *spots* foram lavados duas vezes com 100 µL de bicarbonato de amônio 100 mM, aguardando cerca de 10 minutos entre cada lavagem. Após as lavagens, foram adicionados 100 µL de ACN 100% até os *spots* ficarem cor branca opaca. Em seguida, a ACN foi retirada, aguardou-se a sua evaporação e adicionou-se aos *spots* 45 µL de bicarbonato de amônio 50 mM acrescido de CaCl₂ 5 mM mais 5 µL de tripsina *gold* 100 µg (Promega). Todo o procedimento foi realizado no gelo e após 45 minutos de reação, os tubos foram colocados em estufa a 37 °C com rotação de 135 rpm por 24 h. No dia seguinte, o líquido foi transferido para novos tubos de microcentrífuga devidamente identificados e colocados em *Speed vaccum* (Labcon) a 30 °C até a total evaporação do líquido. Após a digestão, as proteínas foram dessalinizadas utilizando ponteiras acopladas a uma coluna C-18 *PerfectPure* (Eppendorf), de acordo com as instruções do fabricante, e, em seguida, as amostras foram colocadas em *speed vaccum* e ressuspensas em 10 µL de água milli-Q.

8.7. **Análises por espectrometria de massa**

As proteínas dos géis das variedades RB855536 e RB867515 dos controles e do tratamento com solução salina a 100 mM de NaCl submetidas à tripsinização e dessalinização foram analisados utilizando a técnica de espectrometria de massa. As amostras tripsinizadas foram preparadas para análise de MALDI-ToF/ToF (*Matrix-assisted Lases desorption/ionized Time of Flight/Time of Flight*) em um aparelho Ultraflex III MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Um microlitro de amostra ressuspensa em água milli-Q adicionado de 3 µL de uma matriz composta por ácido α-ciano 4-hidroxicinâmico (em uma solução dissolvida com acetonitrila 50 % e ácido trifluoracético 3%) foi homogeneizada e 0,5 µL foi aplicado na placa, em triplicata. As amostras foram secas em temperatura ambiente e o espectrômetro foi operado em modo refletido para a obtenção das massas dos íons gerados pela tripsina e em modo *lift*, onde foram adquiridos os MS/MS

8.8. *Identificação de proteínas*

As massas dos íons encontradas dos fragmentos por espectrometria de massa foram comparadas ao banco de dados não redundante do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o software MASCOT (MASCOT *Matrix Science*, versão *Free* do *software*), assumindo carboxiamidometilação do aminoácido cisteína e oxidação da metionina como modificações. Os resultados encontrados foram avaliados segundo o Mowse score (algoritmo de Mowse) e os valores significativos foram comparados às massas moleculares e pontos isoelétricos das proteínas em análise ou então por meio do sequenciamento *de novo*, onde a sequência foi anotada e efetuou-se uma nova busca no banco de dados de proteínas do NCBI, usando como filtro para a pesquisa no banco de dados a opção plantas, e no banco de dados do Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) foi utilizado o banco de dados de *Saccharum* como filtro.

9. Resultados

9.1. Taxa de fotossíntese líquida foliar e condutância estomática

No último dia, antes da retirada das partes aérea e raiz para as análises de massa seca, foram fotografadas as folhas de ambas as variedades, tanto de plantas controle quanto as folhas de plantas submetidas à salinidade. A salinidade induziu clorose nas folhas da borda para a nervura central e a diminuição no número de folhas na planta como um todo, conforme ilustrado na Figura 4 e Figura 5, respectivamente.

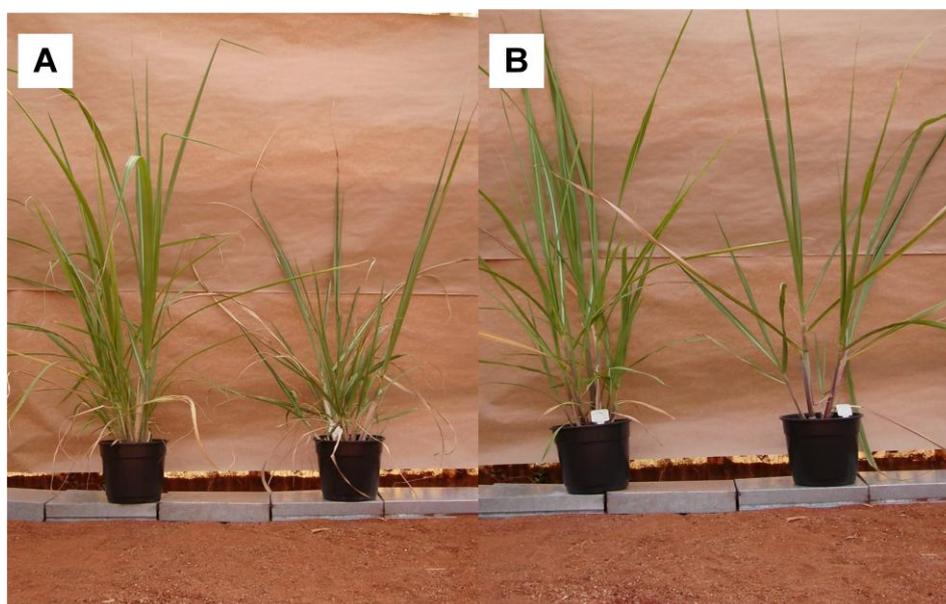


Figura 4: Morfologia das plantas de cana-de-açúcar submetidas a 48 dias de estresse salino. Da esquerda para a direita (A) Variedade RB855536 planta controle tratada com água e planta tratada com NaCl 100 mM. (B) Variedade RB867515 planta controle tratada com água e planta tratada com NaCl 100 mM. Foto: Aline Melro Murad



Figura 5: Aspecto das folhas de cana-de-açúcar submetidas 48 dias de estresse salino após 48 dias. Da esquerda para a direita (A) Variedade RB855536 planta controle tratada com água, (B) Variedade RB855536 planta tratada com NaCl 100 mM, (C) Variedade RB867515 planta controle tratada com água e (D) Variedade RB867515 planta tratada com NaCl 100 mM. Foto: Aline Melro Murad

A análise da taxa de fotossíntese (A) foi realizada para verificar o comportamento fotossintético das variedades RB855536 e RB867515 durante o período de tratamento com 100 mM de NaCl. O desempenho fotossintético das duas variedades durante os 48 dias de teste pode ser observado na Figura 6

Na variedade RB855536, as taxas fotossintéticas das plantas controle e das plantas tratadas com sal permaneceram semelhantes durante os dias de estresse salino. No entanto, nota-se que no dia 48 as plantas tratadas com sal demonstraram uma diminuição mais intensa em relação às plantas controle (Figura 6 A).

Para a variedade RB867515, também ocorreu uma semelhança entre as plantas controle e tratadas com sal durante todo o experimento. Porém, no dia 48 de tratamento, as plantas tratadas diminuíram suas taxas de fotossíntese em relação as plantas controle para este mesmo dia (Figura 6 B). Ao comparar a taxa fotossintética entre as plantas controle das duas variedades, a variedade RB867515 demonstrou uma taxa fotossintética superior de 33% em relação à variedade RB855536 no dia 48.

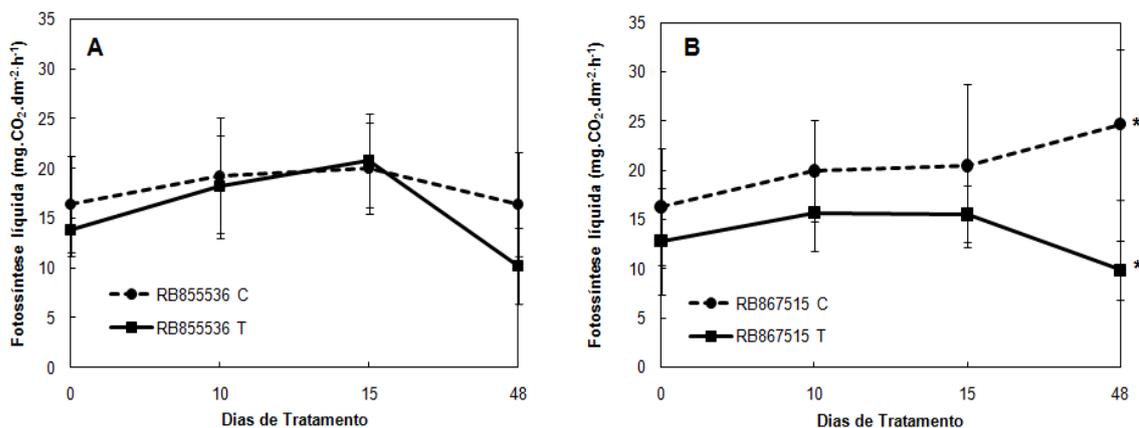


Figura 6: Variação da taxa de fotossíntese líquida expressa em $\text{mg CO}_2\cdot\text{dm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ durante 48 dias de estresse salino de 100 mM NaCl. (A) Variedade RB855536. (B) Variedade RB867515. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=6$). “C” equivale a plantas controle com água e “T” equivale a plantas tratadas com sal. * $P \leq 0,05$

A condutância estomática (g_s) acompanhou as mudanças ocorridas no perfil fotossintético (Figura 7). Na variedade RB855536 (Figura 7 A) e RB867515 (Figura 7 B), os valores de condutância permaneceram semelhantes entre as plantas controles e as plantas tratadas com sal durante os dias de tratamento. Entretanto, no dia 48 as plantas tratadas com sal demonstraram diminuição na condutância estomática em relação às plantas controle.

Com relação entre as plantas controle das duas variedades, a variedade RB867515 mostrou uma condutância estomática superior de 26% em comparação à variedade RB855536 no dia 48.

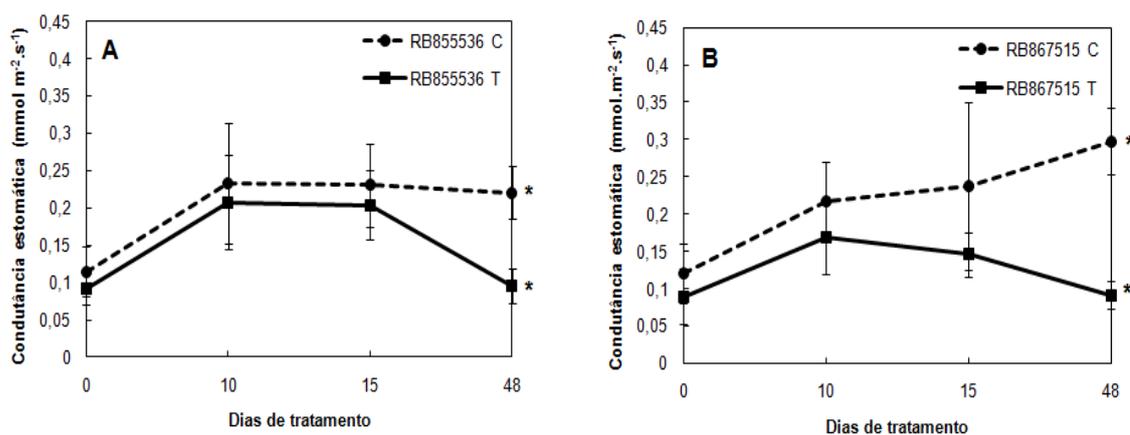


Figura 7: Variação da condutância estomática (gs) expressa em $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 48 dias de estresse salino de 100 mM NaCl. (A) Variedade RB855536. (B) Variedade RB867515. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=6$). “C” equivale a plantas controle com água e “T” equivale a plantas tratadas com sal. * $P \leq 0,05$

9.2. Fluorescência da clorofila a

Na variedade RB855536, a fluorescência da clorofila *a* demonstrou um perfil semelhante desde o início do tratamento tanto nas plantas controle como nas plantas tratadas com sal. No entanto, apesar da semelhança, os valores de F_v/F_m tenderam a diminuir com o tempo de tratamento, porém sem alterações significativas, permanecendo em média $0,74 \pm 0,018$ (Figura 8 A).

Para a variedade RB867515, ocorreu um aumento dos valores de F_v/F_m até o dia 15 nas plantas controle e declinando em seguida no dia 48, permanecendo em $0,746 \pm 0,023$. Nas plantas tratadas com sal, houve um aumento no dia 10, declinando levemente no dia 15 e diminuindo, por fim, no dia 48 ($0,720 \pm 0,017$). Entre as duas variedades, os valores de F_v/F_m demonstraram semelhanças entre as plantas controles e tratadas com sal, sem alterações significativas (Figura 8 B).

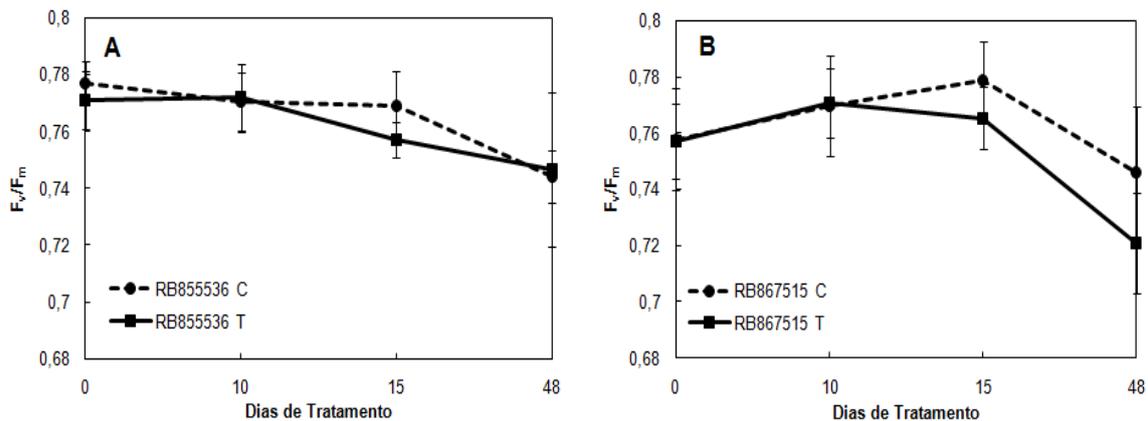


Figura 8 Variação do rendimento quântico potencial do fotossistema II (PSII) de folhas de cana-de-açúcar durante 48 dias de tratamento com água ou solução de NaCl 100mM. (A) Variedade RB855536. (B) Variedade RB867515. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=6). "C" equivale a plantas controle com água e "T" equivale a plantas tratadas com sal. * $P \leq 0,05$

9.3. Potencial hídrico foliar total

Na variedade RB855536, o potencial hídrico das plantas controle aumentou ligeiramente aos 10 dias de estresse e permaneceu constante nos dias 15 e 48. Já nas plantas submetidas à salinidade, o potencial diminuiu no dia 10, aumentou no dia 15, ficando com valores semelhantes ao controle, e, por fim tornou-se mais negativo no dia 48, representando uma diminuição de 34% em relação ao dia 15 (Figura 9 A).

Para a variedade RB867515, o potencial hídrico tanto das plantas controle como das plantas submetidas à salinidade demonstraram um perfil semelhante do dia 0 até o 15º dia de estresse. No entanto, no dia 48, as plantas controle continuaram com valores semelhantes aos dias anteriores e as plantas tratadas com sal tiveram o potencial mais negativo em 34% com relação ao dia 15 (Figura 9 B). Ao comparar as plantas controle das duas variedades, os perfis foram semelhantes durante todo o experimento. Houve uma redução de 34% do potencial hídrico entre os dias 15 e 48 das plantas tratadas com sal de ambas as variedades.

Sendo assim, pode-se dizer que o comportamento das duas variedades (controle e tratadas com sal) é semelhante, não apresentando diferenças significativas.

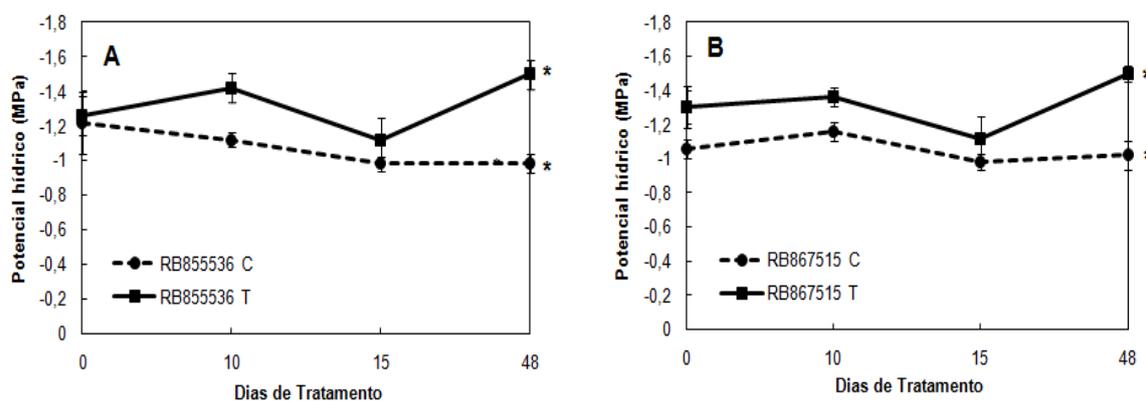


Figura 9: Variação do potencial hídrico (expresso em Mega Pascal (MPa) nas folhas de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino (100 mM NaCl) por 48 dias. (A) Variedade RB855536. (B) Variedade RB867515. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=6). “C” equivale a plantas controle e “T” equivale a plantas tratadas com sal. * $P \leq 0,05$.

9.4. Massa seca total das partes aérea e raiz

A presença de sais no solo pode afetar o crescimento das plantas de diversas plantas e este efeito pode ser claramente visualizado na produção de biomassa. A Figura 10 e a Figura 11 mostram os valores de massa seca da parte aérea e raiz para a variedade RB855536 e valores de massa seca da parte aérea e raiz para a variedade RB867515, respectivamente.

Os resultados mostram diferenças significativas entre a matéria seca acumulada pela variedade RB855536 submetida a tratamento salino com relação à planta controle, tratadas com água. Houve uma redução de 20% tanto para a parte aérea quanto para as raízes (Figura 10 A e B). A mesma diferença significativa pode ser observada entre a matéria seca acumulada para a variedade RB867515. Ocorreu um decréscimo de 30% no acúmulo de massa seca da parte aérea (Figura 11 A) e uma diminuição de 36% para a raiz (Figura 11 B).

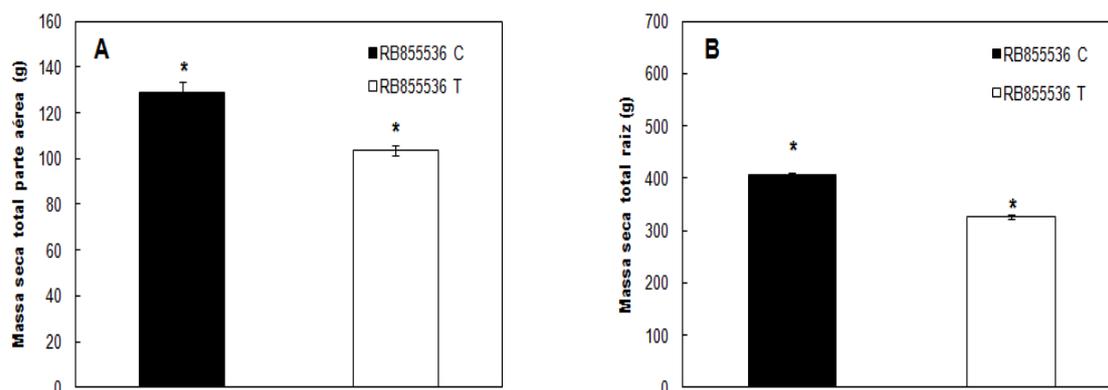


Figura 10: Massa seca das partes aérea e raiz da variedade RB855536 de cana-de-açúcar submetida a estresse salino 100 mM por 48 dias em controles tratados com água. (A) parte aérea e (B) massa seca da raiz. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=6). Barras em preto: plantas controle e barras em branco: plantas tratadas com sal. * $P \leq 0,05$

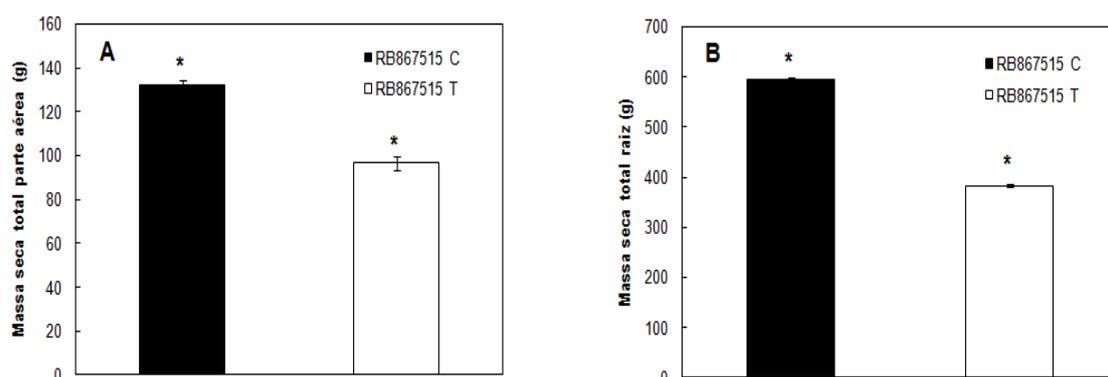


Figura 11: Massa seca de ambas as partes da variedade RB867515 de cana-de-açúcar submetida a estresse salino 100 mM por 48 dias. (A) parte aérea e (B) massa seca da raiz. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=6). Barras em preto: plantas controle e barras em branco: plantas tratadas com sal. * $P \leq 0,05$

Ao comparar a massa seca dos controles entre as duas variedades, nenhuma diferença significativa foi observado com relação a parte aérea. No entanto, ao comparar a massa seca das raízes, foi possível observar um aumento da massa acumulada de 32% para a variedade RB867515 em comparação com a variedade RB855536.

9.5. Macronutrientes e micronutrientes foliares totais

Em relação aos macronutrientes, o elemento nitrogênio não mostrou diferenças entre as plantas do controle e as plantas estressadas para ambas as variedades (Figura 12 A e B).

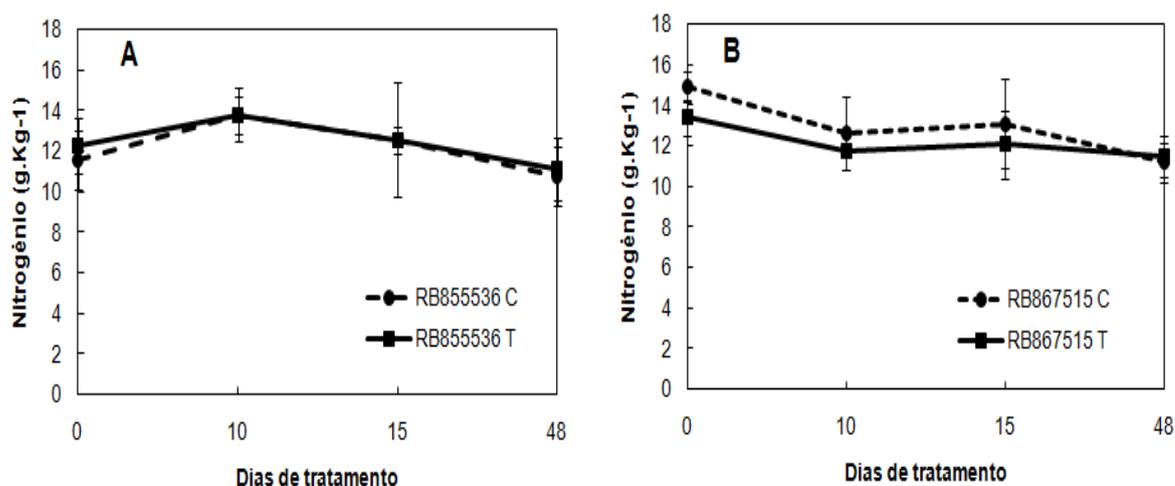


Figura 12: Variação do macronutriente nitrogênio (em g.kg⁻¹) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias de estresse salino. "C" equivale a plantas controle e "T" equivale a plantas tratadas com sal. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n = 6). *P \leq 0,05

O fósforo na variedade RB855536 se mostrou constante até o dia 10 para ambas as plantas controle e tratadas com sal. Entretanto, pôde-se observar nas plantas controle um ligeiro aumento deste elemento no dia 15, decaindo em seguida no dia 48. Nas plantas tratadas com sal, o fósforo diminuiu no dia 15 e se manteve praticamente constante no dia 48 (Figura 12 A).

Já para as plantas controle na variedade RB867515, este elemento diminuiu no dia 10, aumentou no dia 15 e voltou a diminuir no dia 48. As plantas do tratamento salino mantiveram os níveis de fósforo semelhantes até o dia 15, declinando em seguida no dia 48 (Figura 13 B).

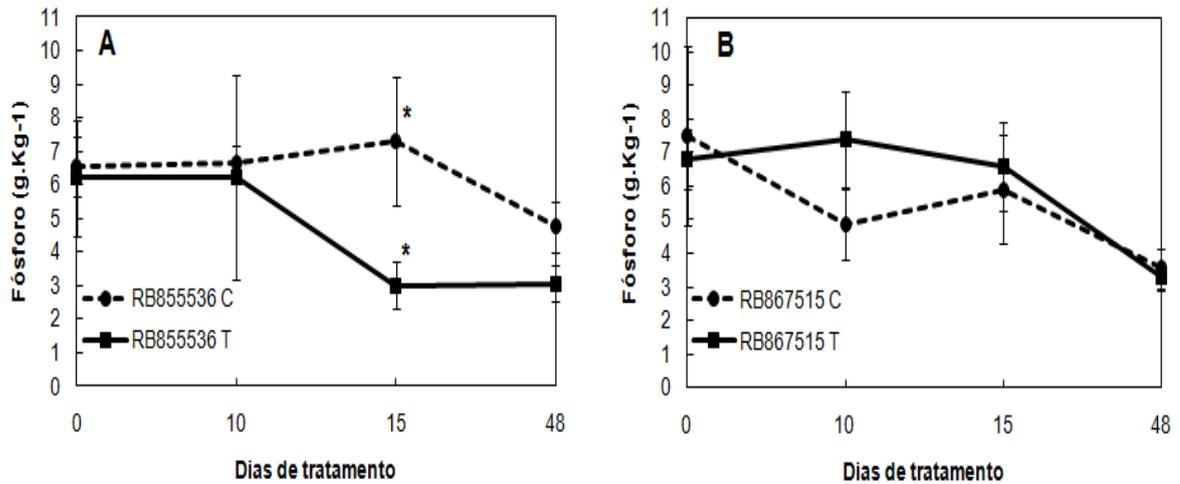


Figura 13: Variação do macronutriente fósforo (em g.Kg^{-1}) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias de estresse salino. “C” equivale a plantas controle e “T” equivale a plantas tratadas com sal. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6$). $*P \leq 0,05$

O potássio nas plantas controle da variedade RB855536 mostrou uma queda até o dia 15, aumentando no dia 48. Nas plantas tratadas com sal, este elemento se manteve quase constante até o dia 15 do teste e no dia 48 este elemento teve um aumento sutil (Figura 14 A).

Na variedade RB867515 não houve mudanças significativas do potássio, onde este se manteve praticamente constante até o dia 15 e aumentando em seguida no dia 48 para ambas as plantas controle e tratadas com sal (Figura 14 B).

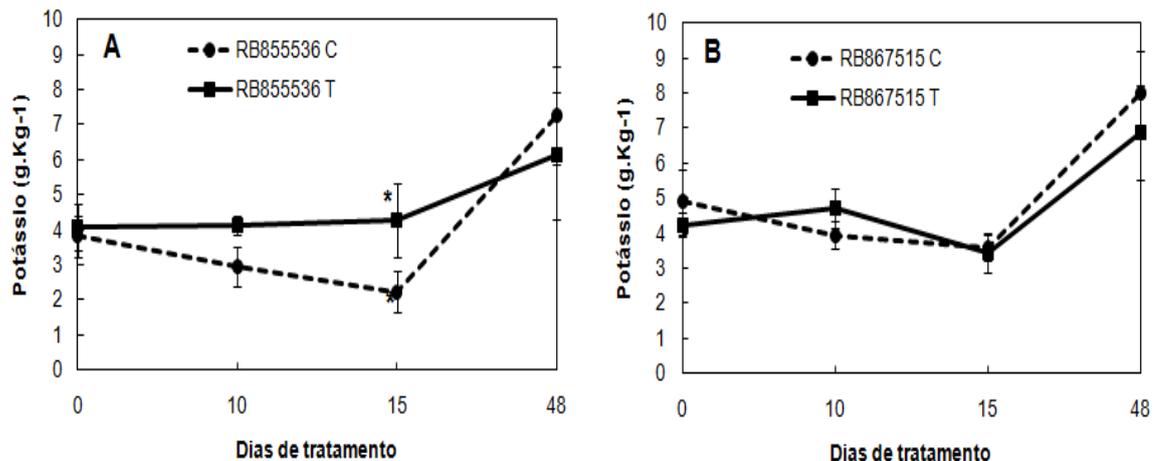


Figura 14: Variação do macronutriente potássio (em g.Kg^{-1}) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias de estresse salino. “C” equivale a plantas controle e “T” equivale a plantas tratadas com sal. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6$). $*P \leq 0,05$

O cálcio na variedade RB855536 aumentou no dia 10 para ambas as plantas controle e tratadas com sal. Contudo, nas plantas controle o seu nível aumentou levemente

no dia 10 e diminuiu no dia 48. Nas plantas tratadas com sal, os níveis de cálcio diminuiram a partir do dia 10 até o dia 48, sem mudanças significativas ao comparar com as plantas controle (Figura 15 A).

Para a variedade RB867515 tanto as plantas controle como as plantas tratadas com sal mostraram um perfil semelhante no conteúdo de cálcio nas folhas, onde este aumentou no dia 10, ficou praticamente constante até o 15º de estresse e diminuiu no dia 48, também sem alterações significativas ao comparar com as plantas controle (Figura 15 B).

As plantas controle de ambas as variedades apresentaram quantidades semelhantes de cálcio nas folhas ao longo do tratamento. Nas plantas tratadas com sal para as duas variedades, os valores dos pontos inicial e final foram semelhantes, indicando que, apesar de terem acumulado cálcio nos dias 10 e 15, os níveis retornaram aos valores do início do tratamento com sal. Além disso, as plantas da variedade RB867515 demoraram mais para diminuir os níveis de cálcio, em comparação com a variedade RB855536.

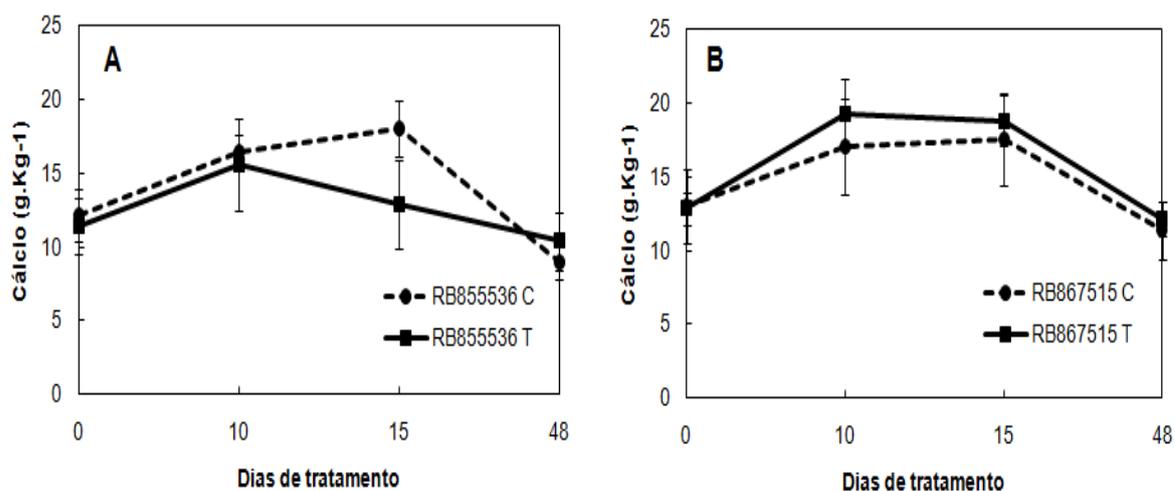


Figura 15: Variação do macronutriente cálcio (em g. kg⁻¹) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias de estresse salino. "C" equivale a plantas controle e "T" equivale a plantas tratadas com 100 mM NaCl. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 6). *P ≤ 0,05

O magnésio para a variedade RB855536 aumentou no 10º dia de estresse para ambas as plantas controle e tratadas com sal. Entretanto, as plantas controle continuaram a acumular este elemento até o dia 15, diminuindo em seguida no dia 48. Nas plantas tratadas com sal o magnésio diminuiu até o dia 48 (Figura 16 A).

Já na variedade RB867515 as plantas controle demonstraram semelhança na quantidade de magnésio até o 15º dia, seguida de queda no dia 48. As plantas tratadas com

sal tiveram um aumento de magnésio no dia 10, seguida de queda no dia 15 e 48 (Figura 16 B).

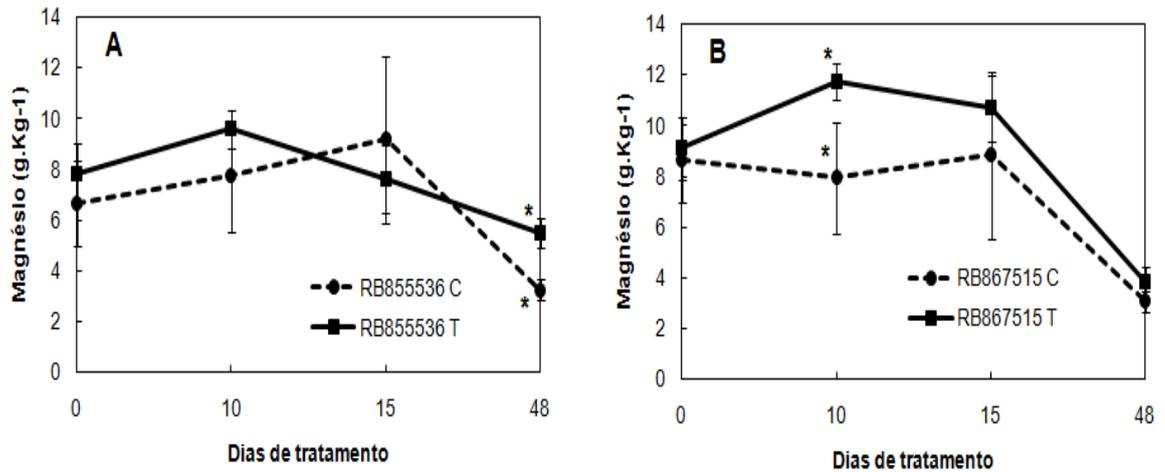


Figura 16: Variação do macronutriente magnésio (em g. kg⁻¹) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias de estresse salino. “C” equivale a plantas controle e “T” equivale a plantas tratadas com NaCl. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 6). *P ≤ 0,05

O elemento enxofre não demonstrou diferenças significativas durante o período de teste ao comparar as plantas controles com as plantas submetidas a estresse salino das variedades RB855536 e RB867515 (Figura 17 A e B). Apesar de não haver diferenças entre as variedades, a RB867515 mostrou um acúmulo de enxofre maior durante o tratamento com sal em comparação com a variedade RB855536.

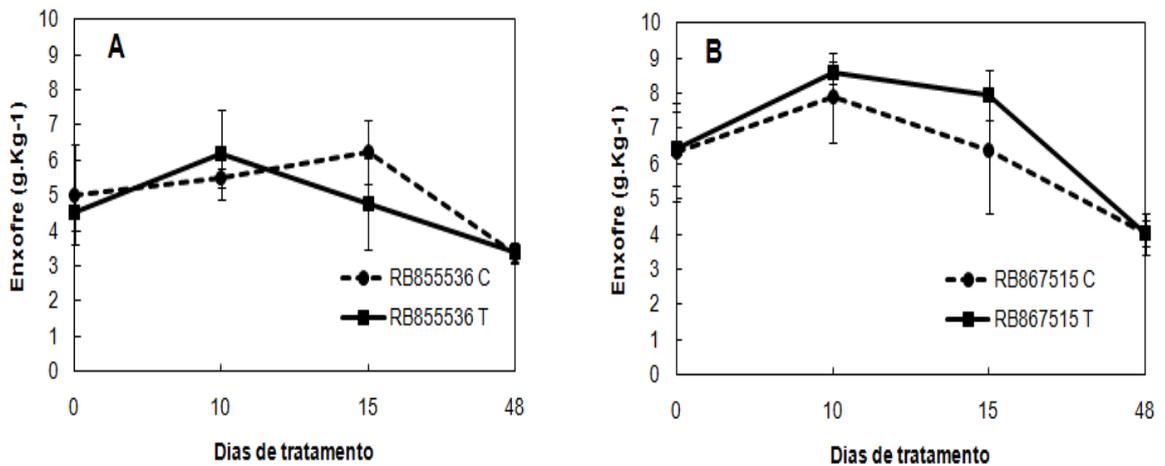


Figura 17: Variação do macronutriente enxofre (em g. kg⁻¹) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias de estresse salino. “C” equivale a plantas controle e “T” equivale a plantas tratadas com NaCl 100 mM. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 6). *P ≤ 0,05

Com relação aos micronutrientes, o elemento alumínio para ambas as variedades mostrou aumento semelhante desde o dia 0 até o dia 48, tanto nas plantas controle quanto nas plantas tratadas com sal, no entanto, sem diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (Figura 18 A e B).

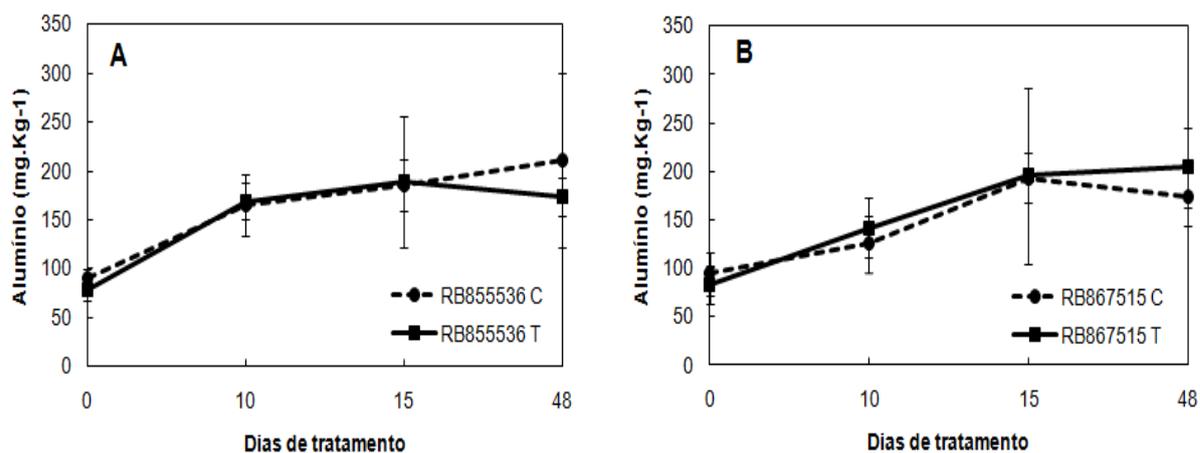


Figura 18: Variação do micronutriente alumínio (em mg. kg^{-1}) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias. "C" equivale a plantas controle tratadas com água e "T" equivale a plantas tratadas com NaCl 100 mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6$). * $P \leq 0,05$

O boro na variedade RB855536 mostrou semelhança entre as plantas controles e tratadas com sal até o 15º dia de estresse e decaindo no dia 48 para ambas as plantas controle e tratadas com sal (Figura 19 A).

Para a variedade RB867515 as plantas controle e tratadas com sal demonstraram uma semelhança na quantidade de boro nas folhas até o dia 15, decaindo no dia 48 (Figura 19 B).

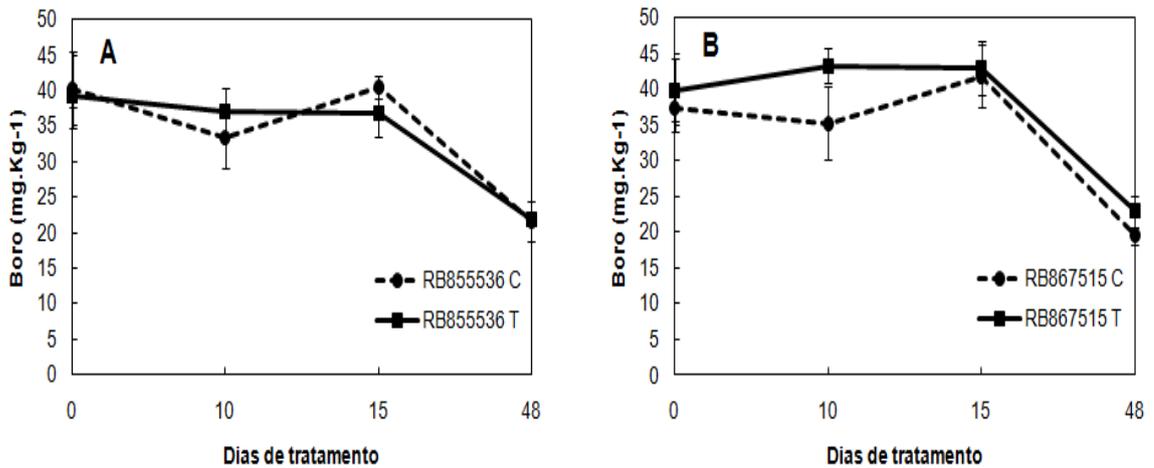


Figura 19: Variação do micronutriente boro (em mg. kg⁻¹) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515(B) durante 48 dias. “C” equivale a plantas controle tratadas com água e “T” equivale a plantas tratadas com NaCl 100 mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n = 6). * $P \leq 0,05$

O elemento cobre não apresentou diferenças estatísticas significativas para ambas as variedades ao comparar as plantas controle com as plantas tratadas com sal, apesar da oscilação deste elemento na variedade RB867515, tendendo a diminuir com os dias de teste (Figura 20 A e B).

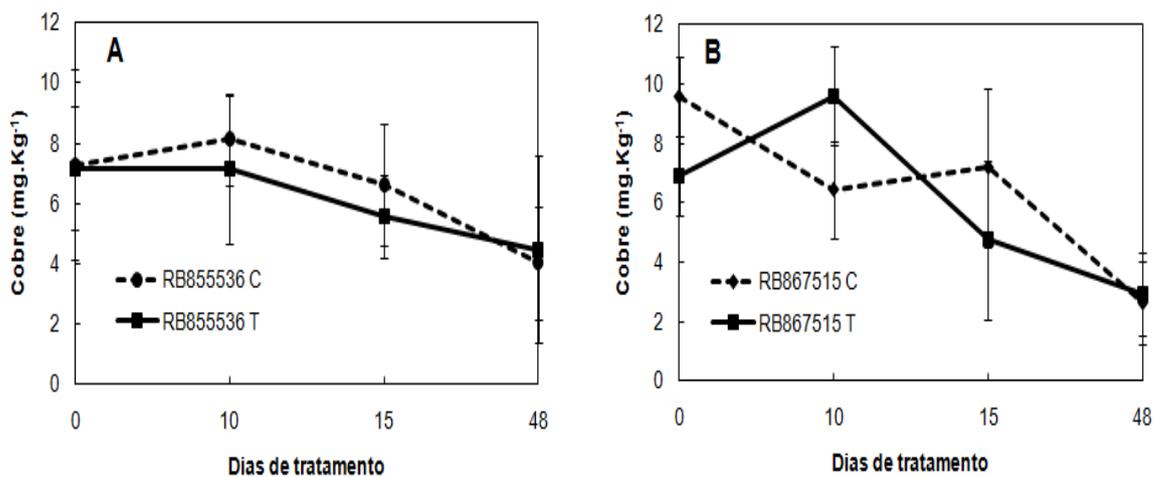


Figura 20: Variação do micronutriente cobre (em mg. kg⁻¹) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias. “C” equivale a plantas controle tratadas com água e “T” equivale a plantas tratadas com NaCl 100 mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n = 6). * $P \leq 0,05$

Apesar da tendência a aumentar o acúmulo de ferro, principalmente no dia 15 na variedade RB867515, não houve diferenças significativas no conteúdo deste elemento entre as plantas controle e as plantas tratadas com sal para ambas as variedades RB855536 e RB867515 (Figura 21 A e B).

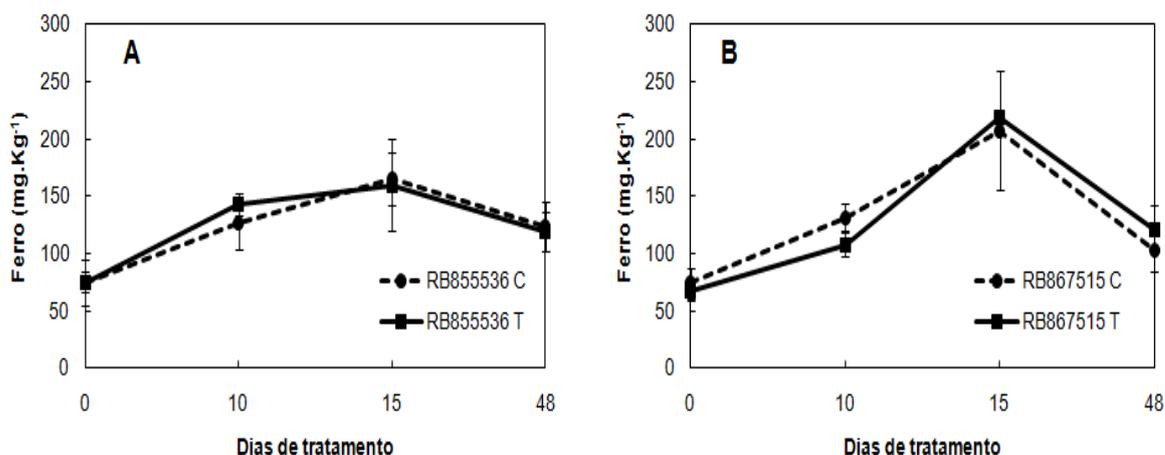


Figura 21: Variação do micronutriente ferro (em mg. kg⁻¹) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias. “C” equivale a plantas controle tratadas com água e “T” equivale a plantas tratadas com 100 mM NaCl. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 6). *P ≤ 0,05

O manganês da variedade RB855536 nas plantas controle aumentou no dia 10, permaneceu quase constante no dia 15 e caiu no dia 48. Nas plantas tratadas com sal este elemento aumentou no dia 10 e decaiu nos dias 15 e 48, sem diferenças estatísticas (Figura 22 A).

Para a variedade RB867515, as plantas controle mostraram um acúmulo sutil até o dia 15 e diminuição no dia 48. Por outro lado, nas plantas tratadas com sal houve um acúmulo deste elemento no dia 10 e decresceu ligeiramente nos dias 15 e 48, sem diferenças estatísticas (Figura 22 B). Entretanto, o acúmulo de manganês no dia 48 para as plantas tratadas com sal de ambas as variedades superou o acúmulo das plantas controle tratadas com água em 60% para a variedade RB855536 e de 52% na variedade RB867515.

Ao comparar este elemento entre nas plantas tratadas com sal das duas variedades no dia 48, foi observado um acúmulo de 13% a mais para a variedade RB867515 em comparação com as plantas tratadas com sal da variedade RB855536.

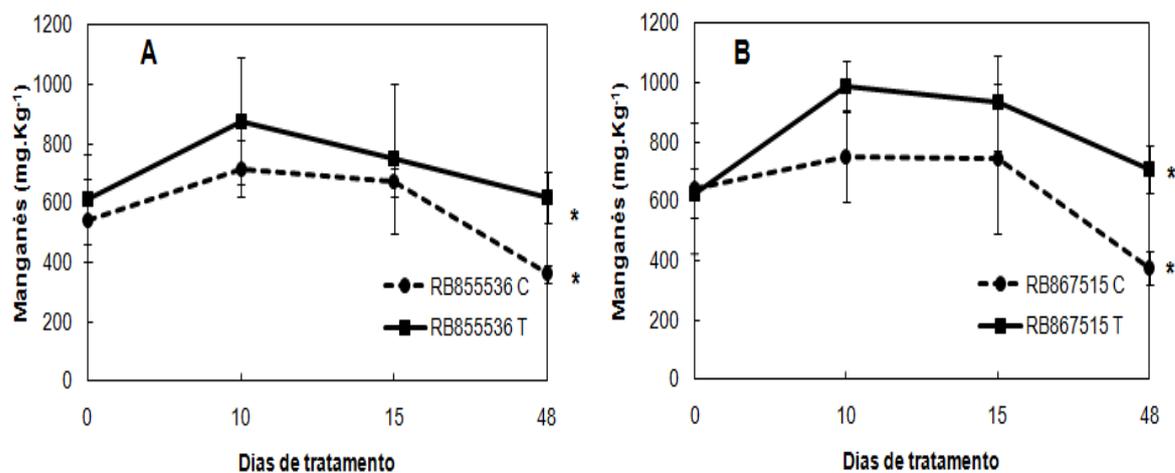


Figura 22: Variação do micronutriente manganês (em mg kg^{-1}) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias. “C” equivale a plantas controle tratadas com água e “T” equivale a plantas tratadas com NaCl 100 mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6$). * $P \leq 0,05$

O elemento zinco para a variedade RB855536 não demonstrou mudanças do dia 0 ao dia 10 para ambas as plantas controle e tratadas com sal. No entanto, nas plantas controle este elemento aumentou 58% no dia 15 em relação ao dia 10 e decresceu no dia 48 para níveis semelhantes aos dos dias 0 e 10. As plantas tratadas com sal não demonstraram alterações durante todo o período de estresse salino (Figura 23 A).

A variedade RB867515 demonstrou um perfil semelhante ao da variedade RB855536, onde no dia 15 ocorreu um acúmulo de 50% a mais de zinco nas plantas controle em relação ao dia 10 (Figura 23 B).

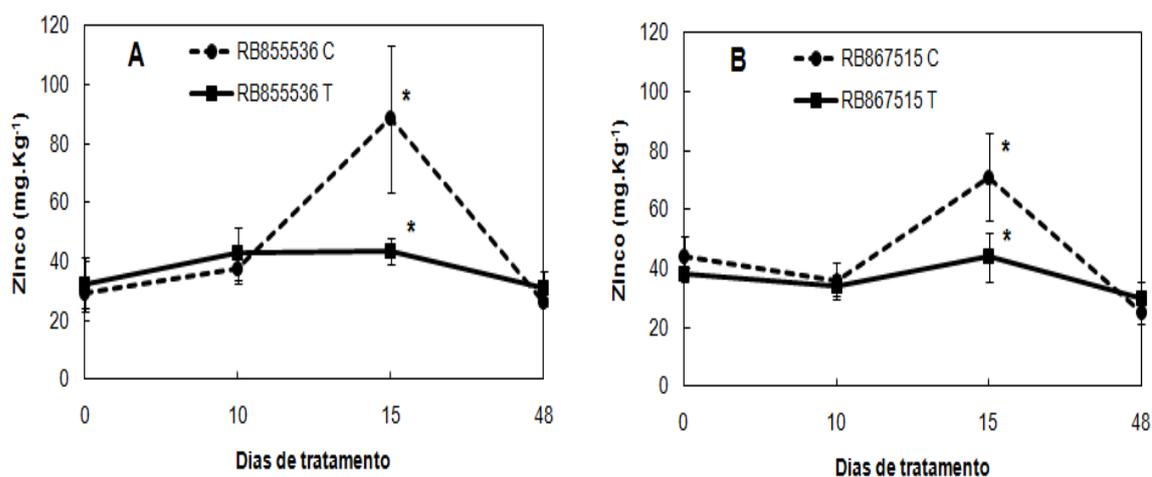


Figura 23: Variação do micronutriente zinco (em mg kg^{-1}) em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB855536 (A) e RB867515 (B) durante 48 dias. “C” equivale a plantas controle tratadas com água e “T”

equivale a plantas tratadas com NaCl 100 mM. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n = 6). * $P \leq 0,05$

9.6. Prolina

Verificou-se a concentração de prolina nas folhas de cana-de-açúcar ao longo do tempo nos diferentes tratamentos para averiguar se esta espécie também se utiliza do aminoácido prolina para algum mecanismo de tolerância à salinidade. Os resultados dos testes para as duas variedades estão mostrados na Figura 24.

Para a variedade RB855536, do dia 0 ao dia 48 não houve acúmulo de prolina com o passar dos dias de tratamento com sal (Figura 24 A). Já para a variedade RB867515 ocorreu um decréscimo de prolina nas plantas controle entre os dias 0 e 10, tornando-se praticamente constante os valores nos dias 15 e 48. Nas plantas tratadas com sal, os valores permaneceram semelhantes nos dias 0 e 10 e aumentou ligeiramente nos dias 15 e 48 (Figura 24 B). Em comparação as duas variedades, houve um maior acúmulo de prolina na variedade RB867515. Contudo, apesar dos valores de prolina serem maiores na variedade RB867515, este é ainda muito baixo, uma vez que os valores das figuras estão representados na base 10^{-3} .

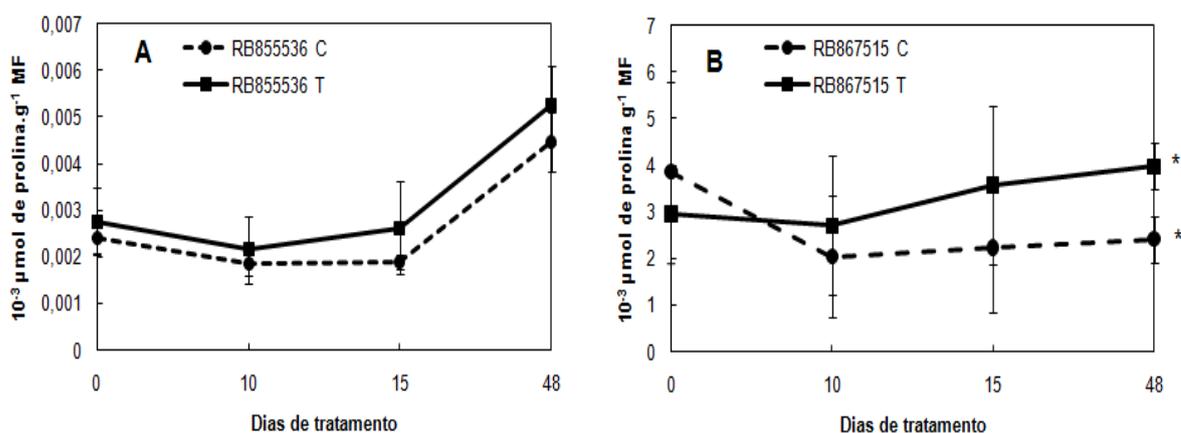


Figura 24: Concentração de prolina foliar em cana-de-açúcar ao longo dos 48 dias de tratamento com sal. Valores apresentados como média \pm desvio padrão (n = 6) na base 10^{-3} e expressos em $\mu\text{mol de prolina} \cdot \text{g}^{-1}$ massa fresca (MF) (A) Variedade RB855536; (B) Variedade RB867515. "C" equivale a plantas controle tratadas com água e "T" equivale plantas tratadas com NaCl 100 mM. * $P \leq 0,05$

9.7. Malondialdeído (MDA)

Para avaliar o grau de peroxidação lipídica em folhas de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino foi realizado o teste de malondialdeído, mostrado na Figura 25 A e B.

Na variedade RB855536, as plantas submetidas a estresse salino mostraram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica desde o dia 0 até o dia 15, diminuindo no dia 48 (Figura 25 A), ao contrário das plantas controles, onde os níveis de peroxidação permaneceram semelhantes.

Já para a variedade RB867515 até o dia 10, para ambas as plantas controle e tratadas com sal, os valores baixos de peroxidação foram baixos. No entanto, nas plantas tratadas com sal, os níveis de MDA aumentaram e atingiram o ponto máximo no dia 15, diminuindo no dia 48 (Figura 25 B)

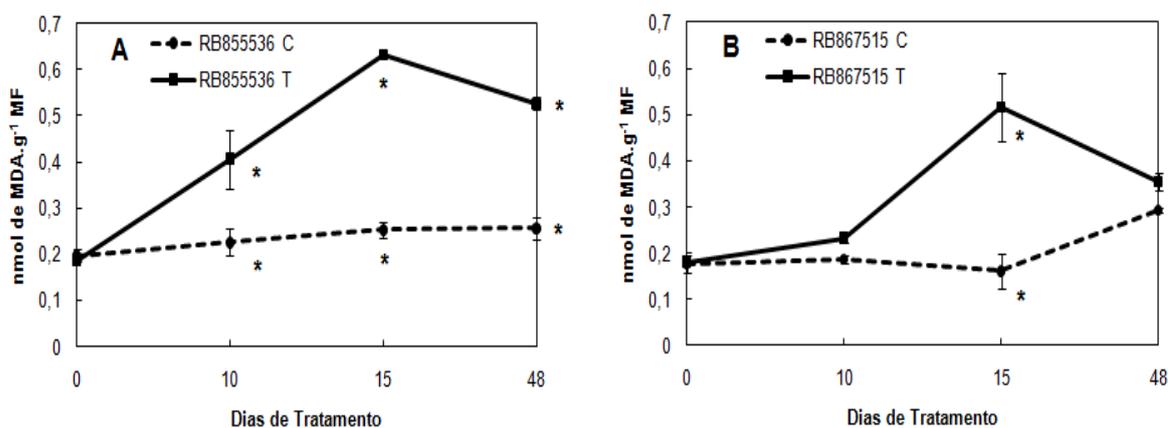


Figura 25: Estado da peroxidação lipídica em folhas de cana-de-açúcar ao longo do tempo determinado pelos níveis de malondialdeído (MDA). Valores apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 6$) e expressos em $\text{nmol de MDA.g}^{-1} \text{MF}$. (A) Variedade sensível RB855536; (B) Variedade tolerante RB867515. "C" equivale a plantas controle tratadas com água e "T" equivale a plantas tratadas com NaCl 100 mM. $*P \leq 0,05$.

9.8. Eletroforese Unidimensional

Com base nas modificações ocorridas nos testes fisiológicos, como a diminuição da taxa fotossintética e a diminuição do potencial hídrico, foram escolhidas as folhas das plantas das duas variedades de cana-de-açúcar aos 48 dias de estresse para a extração de proteínas. A efetividade do protocolo de extração de proteínas totais por meio de solução de fenol/SDS de Wang, Scali *et al.*, 2003 modificado e a metodologia de quantificação de proteínas foram verificadas por meio de análises unidimensionais.

A extração de proteínas por meio deste protocolo demonstrou ser satisfatória, pois este foi eficiente tanto para a extração de proteínas totais, visualizadas no SDS-PAGE como pelo menos dez bandas definidas, assim como na eliminação de contaminantes interferentes na análise protéica, tais como compostos fenólicos e açúcares. A quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) por meio do kit RC/DC (BioRad) demonstrou ser apropriada para esse tipo de extração e material. Proteínas totais, 25 µg, foram aplicadas no SDS-PAGE, onde as amostras RB855536 sal 48, RB855536 controle 48, RB867515 sal 48 e RB867515 controle 48, nomeadas de E5 a E8, respectivamente, demonstraram possuir um perfil protéico semelhante com várias bandas definidas com faixa de massas de 18 e 116 kDa (Figura 26).

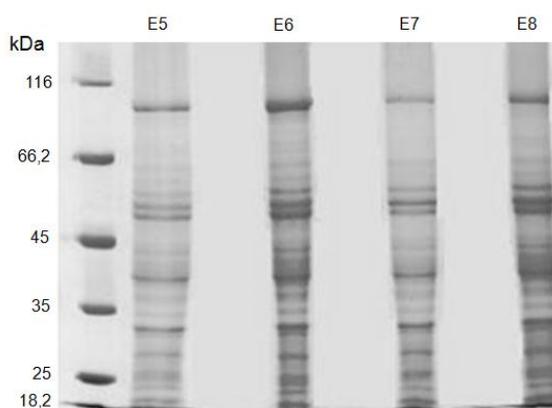


Figura 26: Proteínas foliares totais de cana-de-açúcar corridas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%). Da esquerda para a direita: Marcador molecular de proteínas, amostras protéicas E5 (RB855536 Sal 48), E6 (RB855536 Controle 48), E7 (RB867515 Sal 48) e E8 (RB867515 Controle 48).

9.9. Géis Bidimensionais

Para uma melhor compreensão do perfil protéico das variedades RB855536 e RB867515 em condições de estresse salino, géis bidimensionais foram confeccionados utilizando *strips* de 13 cm não lineares de pI 3-11. Os géis das plantas controle da variedade RB867515 apresentaram em média 353 *spots* bem resolvidos, a maioria situado na faixa de pI de 3 a 7 (Figura 27 A). Os géis de proteínas de folhas de cana-de-açúcar irrigadas com 100 mM de NaCl apresentaram em média 374 *spots* localizados na faixa de pI de 3 a 7 (Figura 27 B). Para a variedade RB855536, os géis das plantas controle apresentaram em média 387 *spots* bem resolvidos, a maioria se encontrava na faixa de pI de 3 a 7. Os géis das plantas submetidas a estresse salino para esta mesma variedade apresentaram em média 409 *spots* também bem definidos, a maioria situando-se na mesma faixa de pI de 3 a 7 (Figura 28 A e B, respectivamente).

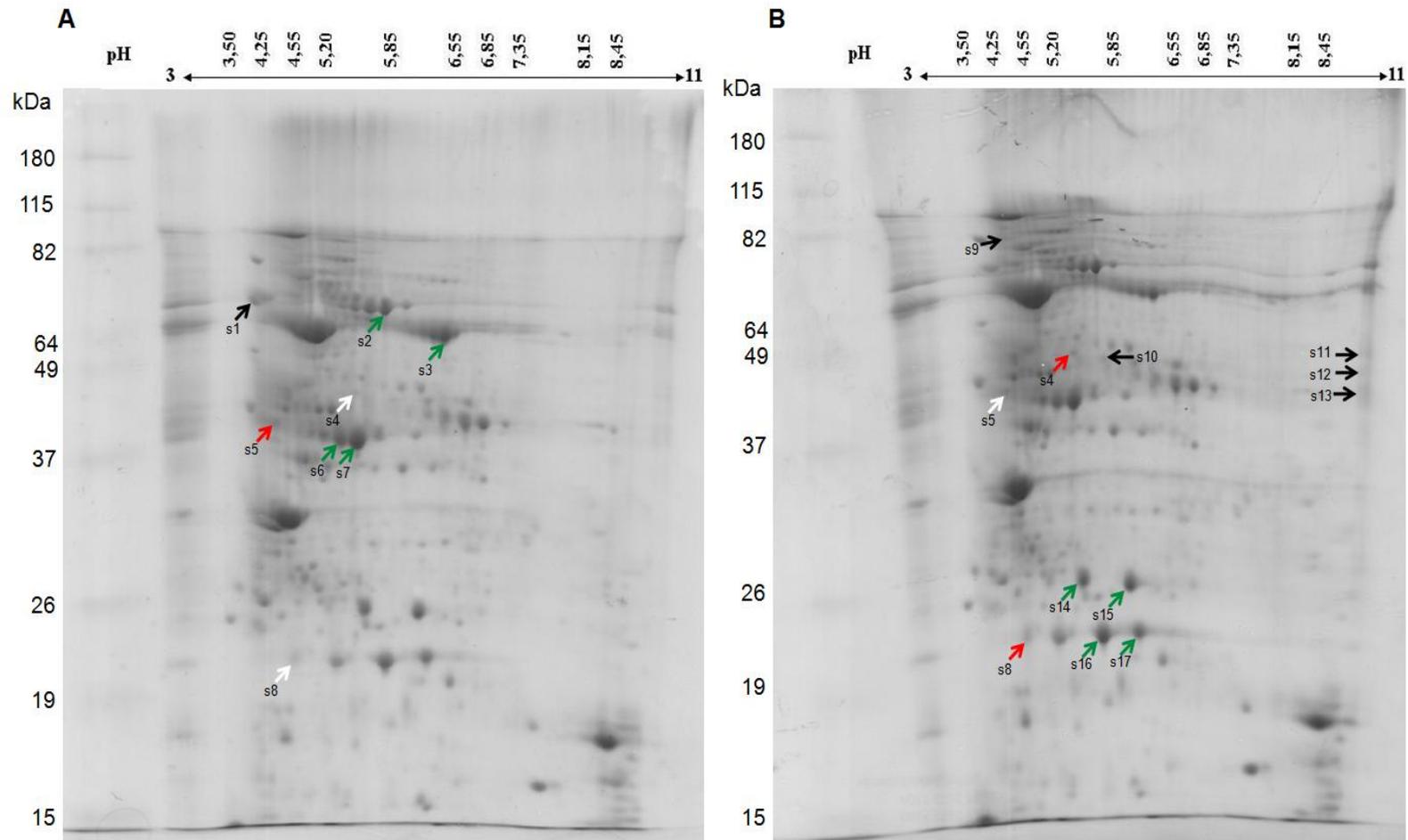


Figura 27: Gel de poliácridamida 12 % da variedade de cana-de-açúcar RB867515. *Strips* de 13 cm não lineares, pl 3 a 11 corados com Coomassie G-250. (A) Gel RB867515 planta controle tratada com água e (B) Gel RB867515 planta tratada com sal. Setas em preto indicam proteínas exclusivas de cada tratamento (controle ou com sal), setas em branco proteínas com expressão diminuída pelo sal, setas em vermelho proteínas com expressão aumentada pelo sal e setas em verde proteínas utilizadas como controle, sem diferença na expressão tanto no controle tratadas com água quanto nos géis das plantas tratadas com sal.

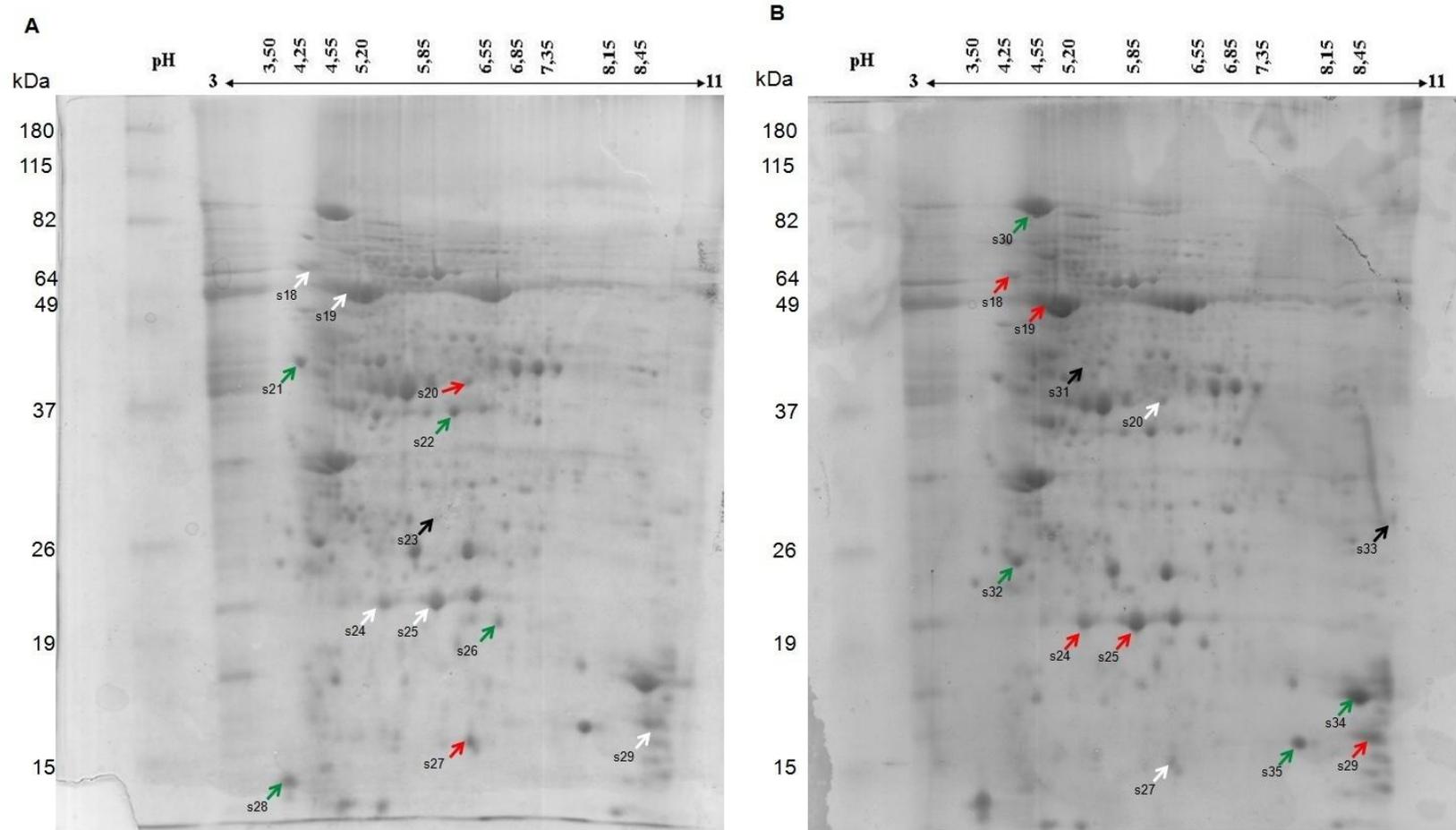


Figura 28: Gel de poliacrilamida 12 % da variedade de cana-de-açúcar RB855536. *Strips* de 13 cm não lineares, pl 3 a 11 corados com Coomassie G-250. (A) Gel RB855536 planta controle e (B) Gel RB855536 planta tratada com sal. Setas em preto indicam proteínas exclusivas de cada tratamento (controle ou com sal), setas em branco proteínas com expressão diminuída pelo sal, setas em vermelho proteínas com expressão aumentada pelo sal e setas em verde proteínas utilizadas como controle, sem diferença na expressão tanto no controle tratadas com água quanto nos géis das plantas tratadas com sal.

Para a detecção e a seleção de proteínas de interesse, as imagens dos géis foram submetidas à análise pelo *software* Bionumerics versão 5.0. Após as análises o programa gerou uma figura em três dimensões, mostrada na Figura 29.

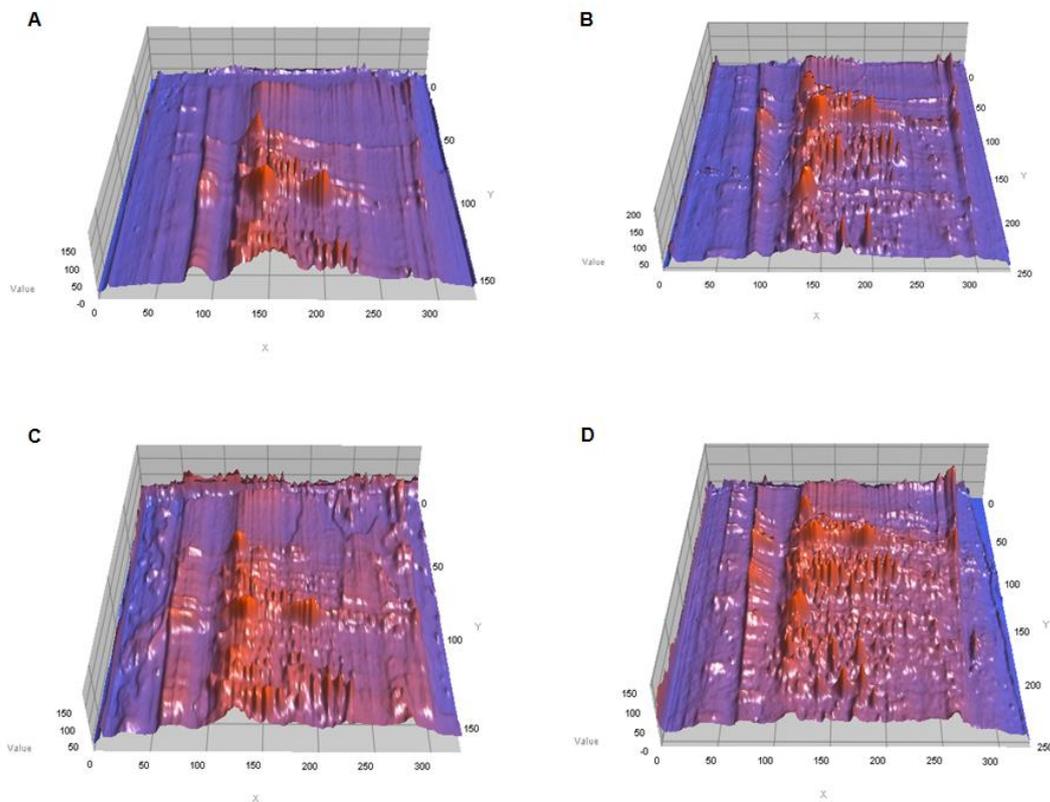


Figura 29: Visualização em 3-D das variedades RB867515 planta controle (A) e planta tratada com sal (B) e da variedade RB855536 plantas controle (C) e planta tratada com sal (D).

Os três géis, representando replicatas técnicas, obtidos para a variedade RB867515 foram comparados entre si pelo programa Bionumerics. No final das análises, o *software* gerou valores de volume para cada *spot*. Por meio dos valores de volume, foram realizadas as análises de regressão linear, utilizando os recursos fornecidos pelo *software* Excel 2007 da Microsoft®, para a obtenção dos valores de r^2 . Os mesmos procedimentos descritos acima foram executados para géis da variedade RB855536.

Os pares de géis das plantas controle da variedade RB867515 apresentaram $r^2 = 0,85$ (Figura 30 A) e os pares dos géis das plantas tratadas com sal desta mesma variedade apresentaram $r^2 = 0,84$ (Figura 30 B).

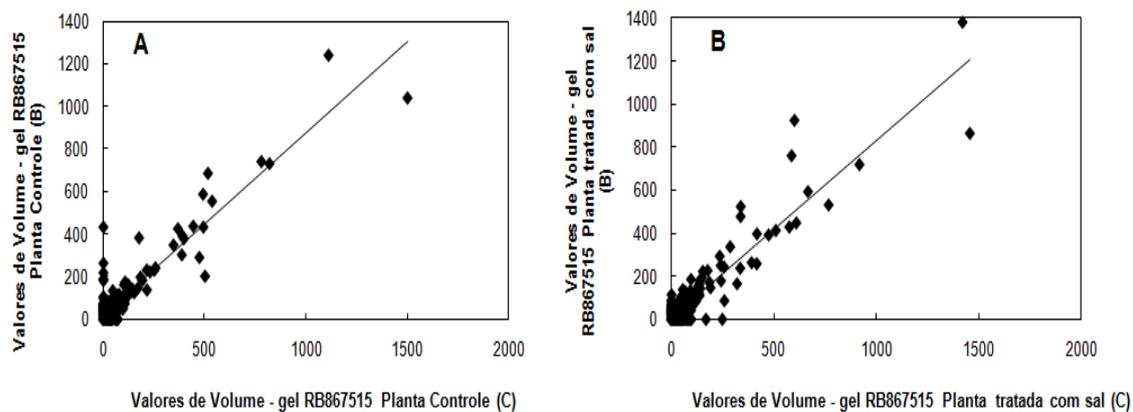


Figura 30: Gráfico da dispersão obtida da comparação dos géis da variedade RB867515 entre si. (A) Correlação entre géis da planta controle $r^2 = 0,85$ e (B) Correlação entre os géis da planta submetida a estresse salino $r^2 = 0,84$.

Os géis das plantas controle da variedade RB867515 foram comparados com os géis de plantas submetidas a estresse salino desta mesma variedade para a detecção de *spots* diferencialmente expressos. Da mesma forma, como foi realizado para os géis dentro de cada situação (controle ou tratado com sal), os valores de volume fornecidos pelo programa para ambas as situações foram utilizadas para gerar um gráfico de dispersão com $r^2 = 0,33$ (Figura 31).

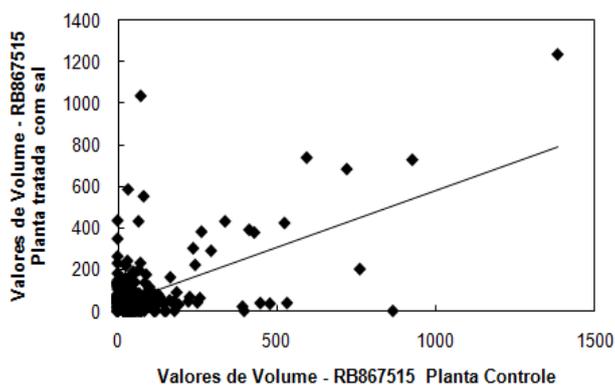


Figura 31: Gráfico de dispersão da correlação dos valores de volume para os géis da variedade RB867515 planta controle e planta tratada com sal. $r^2 = 0,33$.

Para a variedade RB855536, os pares dos géis das plantas controle apresentaram $r^2 = 0,88$ e os pares dos géis das plantas tratadas com sal desta mesma variedade apresentaram $r^2 = 0,85$ (Figura 32).

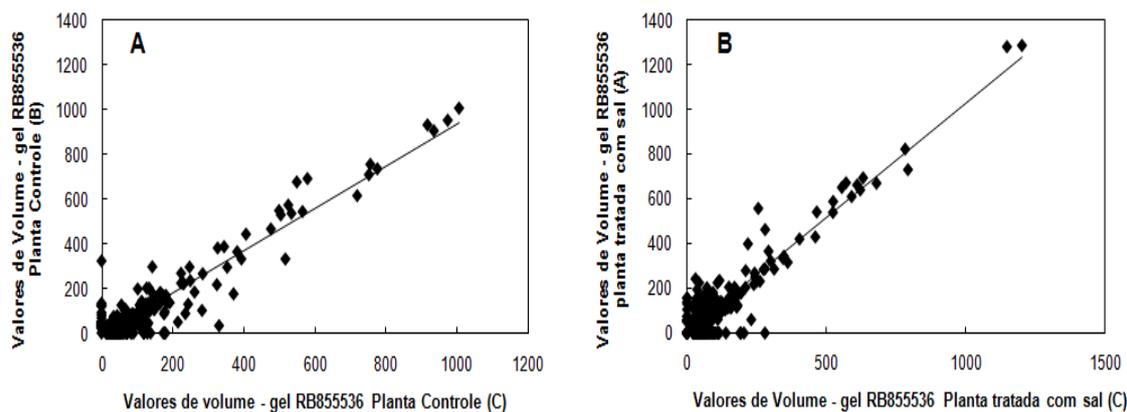


Figura 32: Gráfico da dispersão obtida da comparação dos géis da variedade RB855536 entre si. (A) Correlação entre géis da planta controle $r^2 = 0,88$ e (B) Correlação entre os géis da planta submetida a estresse salino $r^2 = 0,85$

Da mesma maneira descrita para a variedade RB867515, os géis das plantas controle da variedade RB855536 foram comparados entre os géis tratados com sal desta mesma variedade para a detecção de *spots* diferencialmente expressos para visualizar as semelhanças entre si. Os valores de volume fornecidos pelo programa para ambas as situações (controle e sal) foram utilizadas para gerar um gráfico de dispersão com $r^2 = 0,28$ (Figura 33).

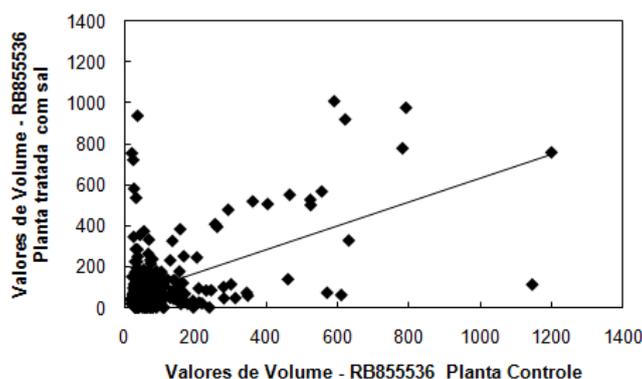


Figura 33: Gráfico de dispersão da correlação dos valores de volume para os géis da variedade RB855536 planta controle e planta tratada com sal. $r^2 = 0,28$.

Com base nos dados dos valores de intensidade relativa obtidos no BioNumerics e de acordo com critério de aumento ou diminuição de pelo menos 2 vezes ou a presença e ausência de proteínas, para a variedade RB867515 foram

selecionados 8 proteínas que tiveram sua expressão diferenciada do gel das plantas controle e 12 proteínas do gel das plantas submetidas a estresse salino, totalizando 20 proteínas. Destes 20, 13 foram identificados sendo 1 diminuiu sua expressão nos géis das plantas controle (s1), 2 somente no gel das plantas submetidas ao estresse salino (s9 e s13), 2 aumentaram a expressão 2x e 2,5x, respectivamente, nas plantas submetidas ao estresse salino (s4 e s8) e 8 foram proteínas designadas para averiguar se ocorreu alguma contaminação com outro tipo de material, além de verificar a acurácia do equipamento, funcionando, dessa forma, como proteínas controle (s2, s3, s6, s7, s14, s15, s16 e s17) (Figura 34 A e B).

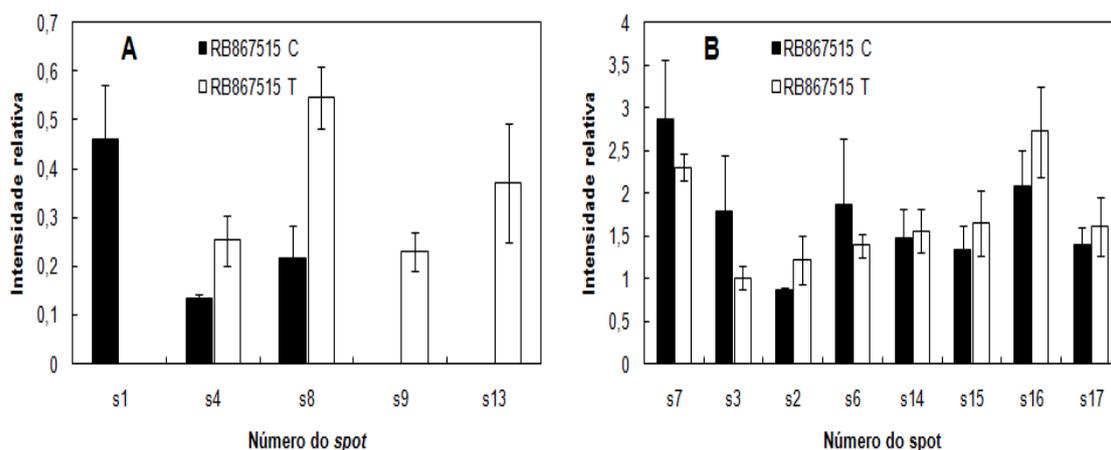


Figura 34: Expressão relativa das proteínas identificadas em folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515. Os valores foram fornecidos pelo programa BioNumerics e expressos como intensidades relativas. (A) proteínas com expressões diferenciadas entre controle e tratado com sal. (B) proteínas utilizados como controle. “C” equivale a géis das plantas controle e “T” a géis das plantas submetidas a estresse salino. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n = 3).

Para a variedade RB855536 foram selecionados 12 proteínas do gel das plantas controle e 13 proteínas do gel das plantas submetidas a estresse salino, totalizando 25 proteínas. Destes 25, 5 foram identificadas (Figura 35), sendo que 4 aumentaram a expressão (2x, 2x, 2,5x e 2x, respectivamente) nos géis das plantas submetidas a estresse salino (s18, s19, s24,s25) e 1 diminuiu sua expressão com relação os géis controle (s23) (Tabela 1).

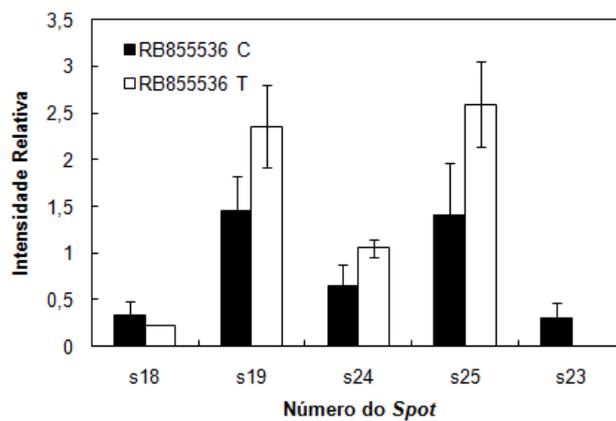


Figura 35: Expressão relativa das proteínas identificadas em folhas de cana-de-açúcar da variedade RB855536. Os valores foram fornecidos pelo programa BioNumerics e expressos como intensidades relativas. “C” equivale a géis das plantas controle e “T” a géis das plantas tratadas com sal. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Tabela 1: Proteínas diferencialmente expressas aos 48 dias em folhas de cana-de-açúcar das variedades RB867515 e RB855536 identificadas após a digestão triptica e análise por MALD-ToF/ToF. ↑ proteínas com aumento de expressão nos géis das plantas submetidas ao estresse salino em relação às plantas controle tratadas com água; ↓ proteínas com diminuição de expressão nas plantas submetidas ao estresse salino em relação às plantas controle tratadas com água; = proteínas controle sem alteração da expressão; S proteínas presentes exclusivamente em plantas submetidas ao estresse salino

pot #	V ariedade	Accessio n # Gene Index/ NCBI	Es pécie	Seq uência	ID	Proteína	Co bertura da sequência (%)	l owseS core	o	Funçã	p I/MM (kDa) Teórico	pl/MM (kDa) Experimental
1 (↓)	R B867515	TC113485 /ACG36798	Sa <i>officinarum</i>	IVDI LVEQGIVPG IK		Frutose 1,6- bifosfato aldolase	2 9,1	7	e	Glicólis	3 50 / 72,24	5,95 / 42,014
7 (=)	R B867515	TC113485 /ACM78035	S. <i>officinarum</i>	EAA YYQQGAR		Frutose 1,6- bifosfato aldolase	2 7,8	13	e	Glicólis	5 38 / 40,00	5,39 / 40,245
3 (=)	R B867515	- /AAN27981	Ho <i>steno-</i> <i>stachys</i>	DTD ILAAFR		RUBISCO subunidade maior	1 9,9	1,6	de CO ₂ (ciclo de Calvin) e fotorespiração	Fixação	7 00 / 67,56	6,04 / 52,766
2 (=)	R B867515	TC112694 /YP_054628.1	S. <i>officinarum</i>	IAQI PVSEAYLG R		ATP sintase CF1 subunidade □	5 3,4	3,9	Produç ão de ATP		5 89 / 71,08	6,32 / 55,294

6 (=)	R	-	<i>Tri</i> <i>ticum</i> <i>aestivum</i>	AAQ DALLR	Frutose 1,6- bifosfato aldolase	2 6,0	7,4	2	Glicólis	5 53,58	5,39 / 40,245
4 (↑)	R	CA117405 / ABF93789.1	<i>S.</i> <i>officinarum</i>	TGIT ADDVNAAF R	Gliceraldeíd o-3- P- desidrogenase	3 6,1	3	3	Glicólis	1 54,99	5,33 / 59,51
9 (S)	R	- /CAC16169	<i>Ze</i> <i>a mays</i>	SSV HDVVLVGG STR	<i>Heat Shock</i> <i>Protein 70</i>	1 8,6	4,3	4	Chaper ona/ ligante a ATP	4 75,78	6,23 / 23,415
8 (↑)	R	TC121006 /ABG46233	<i>S.</i> <i>officinarum</i>	VFL FDDAQVK	<i>Germin-like</i>	1 5,5	9	5		5 22,36	5,68 / 21,815
14 (=)	R	- /ABY52939.1	<i>Or</i> <i>zyza sativa</i>	QYY SWVLTR	Polipeptídeo 23 kDa do PSII	1 6,2	1	5	Possív el Regulação do PS II	5 26,00	8,28 / 28,315
15 (=)	R	CA184061 / ABY52939.1	<i>S.</i> <i>officinarum</i>	TNT DYLAYSGD GFK	Polipeptídeo 23 kDa do PSII	1 6,2	5	6	Possív el Regulação do PS II	6 26,00	8,66 / 26,939
16 (=)	R	TC121006 /ABG46233	<i>S.</i> <i>officinarum</i>	PGV DGLGLSAA R	<i>Germin-like</i>	1 5,0	1	5		5 22,56	5,68 / 21,815

Após a escolha das proteínas de interesse com base nas análises do programa Bionumerics, elas foram digeridas e misturadas a uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (1:3) para a identificação por MALDI-ToF/ToF.

Foram adquiridos 120 espectros de MS/MS, sendo que para a maioria das proteínas sequenciadas pelo menos dois espectros foram obtidos (Anexo I). Proteínas que apareceram em ambos os géis controle e tratado com sal foram identificados como a mesma proteína, aumentando a confiabilidade dos dados, como, por exemplo, a proteína *germin-like* (*spot* s25) e a proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*spot* s4). Para a variedade RB867515 não foi possível identificar 20% das proteínas devido à pouca quantidade de proteínas no *spot* e à baixa intensidade de sinal dos espectros adquiridos no MS/MS (*spots* s5, s10, s11, s12 não identificados).

Proteínas sequenciadas utilizadas como controle na variedade RB867515

Todas as oito proteínas utilizadas como proteínas controle foram identificadas. Dentre elas uma enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase (*spot* s7), duas *germin-like* (*spots* s16 e s17), dois polipeptídeo de 23 kDa do PSII (*spots* s14 e s15), uma ribulose 1,5-bifostato carboxilase/oxigenase (Rubisco) subunidade maior (*spot* s3) e uma ATP sintase CF1 subunidade α .

Proteínas sequenciadas com aumento ou diminuição da expressão na variedade RB867515

As cinco proteínas que tiveram sua expressão aumentada ou diminuída devido ao tratamento salino incluem as enzimas frutose-1,6-bifosfato aldolase (*spots* s1, s6), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*spots* s4, s13), proteína *germin-like* (*spots* s8,). A enzima frutose 1,6-bifosfato aldolase apareceu como duas isoformas (s6 e s7), com mesmas massas e diferentes pl. No entanto, uma terceira proteína também identificada como frutose 1,6-bifosfato aldolase possuindo variações tanto de massa

quanto de pI nos géis controle (s1) foi encontrada. As duas proteínas de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase possuem massas e pI díspares. A proteína *germin-like* aparece em três *spots* com mesma massa, variando somente o pI.

As identificações das proteínas diferencialmente expressas demonstram que 80% das proteínas são relacionadas com o metabolismo energético da planta e 20% relacionadas com proteínas de membrana.

Proteínas identificadas na variedade RB855536

Para a variedade RB855536, somente 20% (5 de 25 proteínas selecionadas) das proteínas foram identificadas. Uma proteína foi encontrada em mais de um *spot* (isoformas) possuindo mesma massa, contudo pI diferentes, *germin-like* (*spots* s24, s25), uma ATP sintase CF1 subunidade β (s19), duas proteínas com função desconhecida, onde uma aumentou sua expressão devido a presença de estresse salino (s18) e a outra proteína (s23) diminuiu sua expressão devido à salinidade.

A identificação revela que para a variedade RB855536, 60% das proteínas correspondem a proteínas de membrana e 40% proteínas hipotéticas.

10. Discussão

A presença de sal no solo afeta várias funções fisiológicas da planta e o efeito prolongado desse estresse pôde ser observado nas folhas. Na variedade RB855536 as taxas fotossintéticas líquidas foram praticamente iguais durante todo o experimento tanto para as plantas controle como para as plantas tratadas com sal, pois ao compararem-se as plantas controle e tratadas com sal pôde ser observado que não houve diferença estatística. Já para a variedade RB867515 as plantas controle, ao contrário da variedade RB855536, continuaram a aumentar suas taxas fotossintéticas enquanto que as plantas estressadas tiveram uma diminuição significativa. As taxas de fotossíntese líquida para o dia 48 entre as plantas controle e tratadas com sal mostraram uma queda na fotossíntese de 58%. Essa queda na fotossíntese sugere que a salinidade pode estar interferindo com mais intensamente na capacidade da variedade RB867515 de realizar fotossíntese e, conseqüentemente, prejudicando o seu desenvolvimento.

A diminuição da condutância estomática na variedade RB867515 corrobora os dados obtidos para taxa fotossintética. Ao analisar a condutância estomática para a variedade RB855536, percebe-se que a condutância entre o 10^o e 48^o dia do início dos testes salinos para as plantas controle se torna quase constante e com taxas superiores aos das plantas submetidas ao estresse salino. Porém, a condutância estomática entre as variedades para o dia 48 não demonstraram diferenças significativas, demonstrando que a eficiência da fotossíntese foi similar entre as variedades.

Wang *et al.*, 2007, utilizando variedades contrastantes de *Populus* spp. descobriram que a planta tolerante foi a primeira a demonstrar os sinais de estresse, resultado do fechamento dos estômatos. No entanto, eles atribuíram o fechamento não devido a toxicidade do íon, mas sim a um aumento do hormônio ABA endógeno da raiz, o qual pode sinalizar o fechamento dos estômatos, reduzindo, assim, a troca gasosa e diminuindo a absorção de sais pela raiz. O fechamento dos estômatos minimiza a perda de água por transpiração, contudo, compromete as funções do cloroplasto afetando, dessa forma, a capacidade fotossintética. O fechamento estomático diminui a capacidade de trocas gasosas, restringindo a disponibilidade de

CO₂ para as reações de carboxilação, levando uma maior resistência a difusão de CO₂ na fase líquida do mesófilo e reduzindo a eficiência da ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Esteves e Suzuki, 2008).

Em longo prazo, o estresse afetou a fotossíntese das duas variedades. Stepień e Johnson, 2009, trabalhando com plantas contrastantes como a glicófita *Arabidopsis thaliana* e a halófita *Thellungiella halophila* submetidas a concentrações de 0 a 500 mM NaCl por 14 dias obtiveram resultados onde plantas possuindo tolerância a estresse salino conseguiram manter sua fotossíntese em níveis normais e as plantas susceptíveis a estresse salino de NaCl tiveram suas taxas diminuídas.

Stepień e Klobus, 2006, trabalhando com salinidade de 0, 50 e 100 mM de NaCl em pepino (*Cucumis sativus* L.) observaram a diminuição da taxa de fotossíntese em decorrência do crescente déficit de água. Plantas de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) irrigadas com soluções salinas em diferentes concentrações tiveram, como resultado, redução da taxa de fotossíntese líquida com o passar dos dias de tratamento (Neves *et al.*, 2009). Em plantas de arroz, as taxas de fotossíntese diminuíram em decorrência do aumento do grau de salinidade a que as plantas foram submetidas (Yang, Xu *et al.*, 2009).

Segundo Esteves e Suzuki (2008) a salinidade pode afetar a taxa de fotossíntese como a mudança da estrutura das células do mesófilo e com a redução da disponibilidade de água diminuindo, assim o potencial hídrico. Os dados obtidos neste trabalho também são consistentes com a possibilidade de que a redução do potencial hídrico pode influenciar nas taxas de fotossíntese. Com 48 dias de estresse, houve uma diminuição do potencial hídrico para plantas tratadas com sal em comparação com as plantas controle de ambas as variedades. Ao comparar os gráficos de fotossíntese e os gráficos de potencial hídrico, percebe-se uma queda mais acentuada aos 48 dias de estresse, podendo inferir que a fotossíntese e o potencial hídrico foram afetados pela salinidade.

No decorrer dos experimentos, o rendimento quântico do PSII, aparentemente, se mostrou sem alterações significativas causadas pela salinidade para ambas as variedades. A maioria dos trabalhos corrobora o fato de soluções salinas afetarem o rendimento quântico dos PSII das folhas. Plantas de sorgo submetidas a diferentes concentrações de cloreto de sódio (0, 50, 100, 150, 200, e 250 mM) resultaram em um decréscimo do rendimento quântico, sem danos maiores ao PSII (Netondo *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos por Stępień e Kłobus (2006), onde as

folhas de pepino tiveram uma redução no valor de Fv/Fm ao serem submetidas a estresse salino de 100 mM de NaCl. Molinari *et al.* (2007) trabalhando estresse hídrico em plantas transformadas de cana-de-açúcar para serem tolerantes a estresse hídrico obtiveram redução da efetividade do PSII em cerca de 20% em plantas transformadas com o gene da P5CS em comparação à redução de 42% das plantas controle. Li *et al.*, 2010, ao estressarem plantas de mamona com até 300 mM de cloreto de sódio evidenciaram uma ligeira queda no rendimento quântico, entretanto não suficiente para danificar o PSII das folhas. Wang *et al.*, 2009, confirmaram, em arroz, uma maior tolerância ao estresse salino demonstrado pelos valores da relação Fv/Fm de uma variedade tolerante ao sal comparado com uma cultivar sensível.

Falqueto *et al.*, 2007 encontraram valores de Fv/Fm em torno de 0,810 em cultivares de arroz em condições normais. Embora obtivessem diferenças significativas entre os cultivares, os valores do rendimento quântico ficaram dentro dos padrões observados para a maioria das espécies vegetais em ausência de qualquer estresse abiótico. Os resultados obtidos neste trabalho para o rendimento do PSII demonstram uma leve diminuição do rendimento quântico, o que pode indicar uma pequena danificação no PSII. O rendimento quântico do PSII pode variar de acordo com a espécie, o tempo de exposição das plantas a salinidade, assim como a concentração da solução salina.

A presença de cloreto de sódio no solo durante os 15 dias após o início do tratamento salino, aparentemente, não afetou a absorção de água pelas raízes nas em ambas as variedades submetidas à salinidade. Esse resultado pode ser devido somente a algum re-ajustamento osmótico ocorrido nas células das raízes, como a compartimentalização do Na⁺ para dentro dos vacúolos, minimizando sua toxicidade no citosol (Blumwald *et al.*, 2000).

Apesar de o potencial hídrico nas folhas de cana-de-açúcar ter aumentado no dia 15, este diminuiu aos 48 dias de estresse para ambas as variedades submetidas a estresse salino, em comparação com as plantas controle (Figura 9). Esse resultado pode ser devido à escassez de água na planta provocada pelo estresse salino.

Resultados semelhantes foram obtidos por Plaut *et al.*, 2000, com cultivares relativamente tolerantes e sensíveis de cana-de-açúcar. A absorção da água acontece quando as forças de extração de água pelas raízes são maiores que as forças de retenção do solo. A partir do momento em que as forças de retenção da água pelo solo são maiores às forças de extração inicia-se, portanto, um quadro de escassez de

água na planta (Verslues *et al.*, 2006). A presença de sais na solução do solo tendem a diminuir o potencial osmótico dessa solução piorando o quadro de estresse hídrico nas plantas, podendo danificar os transportadores de elétrons fotossintéticos dos fotossistemas, inativando-os irreversivelmente (Allakhverdiev *et al.*, 2000) e prejudicando os processos fotossintéticos, como foi evidenciado para ambas as variedades. Em resumo, as diferenças encontradas no potencial hídrico foram somente entre as plantas controle e tratadas com sal da mesma variedade, não havendo diferenças entre as variedades.

Na variedade tolerante à seca RB867515 houve uma maior diminuição para a parte aérea e para as raízes pela salinidade, em relação à variedade RB855536. O estresse salino normalmente é seguido por reduções das taxas de crescimento foliar e das raízes, pois o sal induz o fechamento dos estômatos pela falta de água na célula o que, como consequência, diminui a taxa de fotossíntese e dos produtos fotossintéticos (Lacerda *et al.*, 2006; Hajlaoui *et al.*, 2010).

Contudo, o mais interessante de se observar foi o acúmulo de massa das raízes entre as duas variedades do controle. As plantas da variedade RB867515 acumularam 32% a mais de massa seca que a variedade RB855536. Resultado semelhante foi obtido por Cambraia *et al.*, 1991, com plantas de sorgo tolerantes a alumínio e por Mohammad *et al.*, 1998, com plantas de batata submetida a estresse salino suplementado com fósforo. Ambos os autores verificaram que houve maior acúmulo de massa seca de raiz nas plantas tolerantes em comparação às sensíveis.

Em estudos sobre o rendimento potencial da cana-de-açúcar em São Paulo feitos por Van Den Berg *et al.*, 2000 foi verificado que quanto maior o volume de raízes por camada, maior é, também, o rendimento potencial da cultura, tanto para cana planta (primeiro corte) como para cana soca (segundo corte). Além disso, os autores afirmam também que o rendimento tende a aumentar com o aumento do volume de raízes.

O aprofundamento das raízes é bastante comum em formações savânicas, como o cerrado brasileiro. Savanas são formações vegetais formadas por estrato arbóreo/arbustivo laxo associado a um estrato herbáceo, crescendo em um ambiente submetido a secas sazonais e cuja vegetação é adaptada a sobreviver a queimadas naturais recorrentes (Mistry, 2000). Uma das adaptações à sobrevivência nas épocas secas está o aprofundamento e a ramificação das raízes (Palhares *et al.*, 2010). Plantas como, por exemplo, sucupira (*Pterodon pubescens*) capta água

preferencialmente a 1-2 metros de profundidade, já a árvore pau-terra (*Qualea grandiflora*) consegue retirar a água a uma profundidade de 3 a 4 metros. Entretanto, existem árvores cuja profundidade da raiz pode alcançar 8 metros (lateralmente) e 12 metros (verticalmente) (Sternberg *et al.*, 2004).

Sendo assim, o aumento da massa de raiz pode ser um dos mecanismos pelos quais a variedade RB867515 pode ser realmente mais tolerante ao estresse hídrico. Se o sistema radicular dessa cultivar pode se aprofundar mais no solo e possuindo também várias ramificações, a absorção de água pelas raízes tornar-se-ia mais eficiente, dando a continuidade das atividades fisiológicas da planta de cana-de-açúcar mesmo em condições de seca.

Os nutrientes das plantas podem ser classificados em elementos móveis e imóveis, ou seja, elementos que são realocados das folhas senescentes para as folhas mais novas ou elementos que não são realocados durante a senescência. Os elementos nitrogênio, potássio, magnésio, fósforo, cloro, sódio, zinco e molibdênio são classificados como nutrientes móveis e os elementos cálcio, enxofre, ferro, boro e cobre como elementos imóveis (Taiz e Zeiger, 2004).

O teor de nitrogênio (Figura 12) de ambas as variedades não foi afetado pela salinidade durante o período de 48 dias de estresse salino. Resultados semelhantes foram obtidos por Monte *et al.*, 2004, em plantas de banana submetidas a estresse salino de 70 mM por 44 dias.

Depois do nitrogênio, o fósforo é um dos elementos mais limitantes no solo. A uma primeira instância, o fósforo é absorvido pelas raízes na forma do íon monovalente (H_2PO_4^-) e mais lentamente como íon divalente (HPO_4^{2-}). O que controla a quantidade dos íons monovalentes e divalentes é o pH do solo. Em pH's abaixo de 7 prevalece a forma monovalente do íon e em solos com pH acima de 7 prevalece os íons divalentes (Dechen e Nachtigall, 2007). O fósforo é uma parte essencial de vários açúcares fosfatados envolvidos em processos como fotossíntese, respiração e outros processos metabólicos. Ele também faz parte de nucleotídeos como RNA e DNA, fosfolipídios presentes nas membranas e desempenha um papel fundamental no metabolismo energético para a produção de energia por meio de ADP, ATP e pirofosfatos (PPi) (Santos *et al.*, 2008).

A variedade RB867515 conseguiu manter os níveis semelhantes de fósforo até 15 dias após o início dos experimentos, diminuindo no dia 48 para ambas as plantas

controle e tratada com sal. Embora a variedade RB855536 manteve os níveis de P até o dia 10, as plantas tratadas com sal mostraram uma diminuição significativa no dia 15. Isto demonstra os impactos negativos da salinidade sobre os níveis de fósforo nas folhas de cana-de-açúcar.

No entanto, ao verificar as plantas controle no final do experimento para a variedade RB867515, os níveis de P também diminuem. Isto pode indicar que este elemento pode estar sendo realocado das folhas mais velhas (senescentes) para as folhas mais novas. No entanto, ao comparar com os resultados do nutriente nitrogênio, um elemento altamente móvel de folhas senescentes para folhas novas, este não demonstra sinais de realocação. Uma resposta para este fenômeno seria algum distúrbio, como um desbalanço osmótico, provocado pela salinidade nas plantas tratadas com sal.

Durante os tempos de 10 e 15 dias de tratamento, as concentrações de potássio nas folhas das plantas submetidas ao estresse salino superaram as concentrações das plantas controle, irrigadas com apenas água para a variedade sensível RB855536. Embora no 48º dia após o início do teste salino as concentrações do potássio entre o tratamento salino e controle não apresentaram diferenças, nota-se uma tendência do K^+ aumentar com o tempo de exposição ao estresse salino. Possivelmente, este aumento de K^+ está relacionado a um ajustamento celular em reação à presença em excesso de íons Na^+ , onde o potássio, presente nos vacúolos, é liberado no citoplasma no intuito de amenizar os efeitos negativos do sódio (Taiz e Zeiger, 2004) ou pela absorção de potássio do solo pelas raízes (Monte *et al.*, 2004).

Os íons potássio desempenham um papel fundamental na regulação do potencial osmótico das células. Por meio de proteínas transportadoras (bombas), a célula é capaz de controlar a entrada e saída dos íons Na^+ e K^+ para a manutenção da homeostasia celular. Em baixas concentrações de salinidade, as plantas mantêm as concentrações de K^+ elevadas e baixas as concentrações de Na^+ no citoplasma. No entanto, o aumento das concentrações de Na^+ no meio radicular pode levar a inibição da absorção de íons K^+ devido à competição entre estes dois cátions monovalentes pelo mesmo sítio do sistema de absorção da membrana plasmática das células radiculares, reduzindo, assim, crescimento das plantas, por deficiência deste elemento essencial (Monte *et al.*, 2004; Esteves e Suzuki, 2008).

As respostas das plantas ao estresse salino podem variar entre espécies e entre plantas. Gunes *et al.*, 2007 verificaram que os níveis de K^+ nas plantas de milho

crescidas em solo salino de 40 mM por 8 semanas aumentaram os níveis de K^+ . Porém, Monte *et al.* (2004) observaram que plantas de bananeira cultivadas sob estresse salino de 60 mM por 44 dias não sofreram alterações nas concentrações de K^+ foliares. Azevedo Neto e Tabosa, 2000 verificaram a diminuição de potássio em plântulas de milho em vários níveis de estresse salino com NaCl. Neto *et al.* (2004) verificaram uma redução nos níveis de K^+ nas folhas em vários genótipos de milho submetidos a estresse salino em contraste com as raízes de um dos genótipos que não mostrou diferenças significativas. Plaut *et al.* (2000) submeteram por 60 dias duas variedades relativamente tolerante e sensível a sal à cinco diferentes intensidades de salinidade. Eles observaram que conforme a salinidade aumentou, ocorreu, também, um aumento no acúmulo deste íon nas duas variedades, no entanto sem diferenças significativas. Estes resultados se assemelham aos resultados obtidos neste trabalho, onde se verificou um aumento dos teores de potássio nos tempos maiores investigados. Garcia *et al.* (2007) utilizando folhas de plantas adultas de milho encontraram diminuição dos teores de K^+ submetidas a estresse salino. Dessa forma, a concentração de potássio nas folhas pode variar entre espécies e entre variedades da mesma espécie conforme a severidade do estresse, assim como o tempo de exposição das plantas ao estresse.

Os teores de cálcio, durante os 48 dias de estresse salino, não apresentaram diferenças significativas entre as plantas controles, tratadas com água, e as plantas tratadas com sal para ambas as variedades, apesar da diminuição mais rápida na variedade RB855536 a partir do 10^o dia de estresse. Alguns autores relatam a diminuição nos teores deste elemento devido a salinidade (Garcia *et al.*, 2007; Hajlaoui *et al.*, 2010). Em plantas de cana-de-açúcar, Plaut *et al.* (2000) observaram que folhas de cana-de-açúcar irrigadas com solução salina por 68 dias acumularam menos cálcio em contrapartida com o aumento de cálcio nas raízes. De acordo com Staut, 2010, o cálcio é um nutriente importante para o bom desenvolvimento do sistema radicular das plantas, por ser um elemento essencial para a formação da parede celular das raízes. Além disso, o cálcio não se move facilmente dentro da planta, sendo assim, a sua deficiência no solo pode influenciar o crescimento das raízes mais novas e diminuir a semipermeabilidade da parede para a absorção dos nutrientes.

Os dados obtidos neste trabalho, em que o cálcio não mostrou alterações em seus teores nas folhas podem indicar que a concentração deste elemento pode ser maior nas raízes, no entanto, testes para analisar a concentração deste íon nas raízes devem ser conduzidos para averiguar esta possibilidade.

As plantas tratadas com sal para a variedade RB867515 manteve o magnésio em níveis maiores até o 15º dia de estresse em comparação com as plantas controle, diferente da variedade RB855536, onde os níveis foram semelhantes entre as plantas controle e tratadas com sal neste mesmo período. O aumento no teor de magnésio pode indicar que a variedade RB867515 mostrou um comportamento mais resistente à salinidade. A diminuição dos teores de magnésio no final do experimento nas plantas tratadas com sal para a variedade RB867515 corrobora os dados obtidos de fotossíntese, também neste mesmo dia, no qual foi possível observar um decréscimo na fotossíntese (Figura 16). No entanto, os níveis de magnésio nas folhas controle desta mesma variedade também declinaram, levando a crer que o número de repetições pode ser crucial na análise de nutrientes foliares.

O magnésio possui um papel fundamental nas células vegetais. Esse nutriente está envolvido em reações enzimáticas dos processos de respiração e fotossíntese e de síntese de moléculas de RNA e DNA. Além disso, o Mg^{2+} faz parte da molécula de clorofila, molécula essencial para a produção de fotoassimilados (como os açúcares) e oxigênio. A carência desse íon leva ao desenvolvimento de manchas cloróticas entre as nervuras das folhas, acontecendo primeiramente nas folhas mais velhas por conta da mobilidade deste íon (Shaul, 2002). Além disso, a senescência das plantas pode ser acelerada devido a presença de estresse salino nas plantas. Santos *et al.*, 2001, estudaram a influência do estresse salino provocado por cloreto de potássio (KCl) em calos e plantas de girassol, onde as plantas sofreram senescência mais rapidamente com a diminuição do magnésio em comparação com os calos.

Íons com características semelhantes tendem a competir entre si pelos sítios de ligação aos transportadores presentes nas membranas das células das raízes. Íons de cálcio e de magnésio competem entre si por essa ligação, no entanto os transportadores possuem mais afinidade por Ca^{2+} que por Mg^{2+} , levando, muitas das vezes, a uma elevação no teor de Ca^{2+} em detrimento do de Mg^{2+} nas folhas (Grattan e Grieve, 1999). No entanto, no presente trabalho não se evidenciou diferenças entre as concentrações de cálcio nas folhas, permanecendo em níveis semelhantes entre as plantas controle e tratadas com sal.

Vários trabalhos na literatura relatam a diminuição de magnésio foliar ao longo da exposição das plantas ao estresse salino (Kamel e El-Tayeb, 2004; Garcia *et al.*, 2007; Bosco *et al.*, 2009). No entanto, os trabalhos referentes a estudos sobre as concentrações deste nutriente em plantas expostas ao estresse salino são bastante escassos, principalmente para plantas de cana-de-açúcar, o que leva a uma

necessidade de estudos mais aprofundados sobre esse assunto em cultivos de cana-de-açúcar.

Apesar de não haver diferenças significativas entre as plantas controle e tratada com sal de ambas as variedades, a variedade RB867515 apresentou teores maiores de enxofre, em comparação com as plantas controle e tratadas com sal da variedade RB855536. O enxofre está presente em aminoácidos como a cisteína e a metionina e possui um papel fundamental na constituição de inúmeras coenzimas e grupos prostéticos como a tiamina pirofostato (TPP), ácido lipóico e coenzima A. Esses componentes são essenciais para o funcionamento do sistema multienzimático que controla a descarboxilação do piruvato necessário para iniciar o ciclo de Krebs. Além disso, o enxofre constitui também é componente das ferredoxinas, sulfolipídeos e esfingolipídeos, moléculas envolvidas em vários processos em que ocorre a transferência de elétrons e manutenção estrutural das membranas celulares (Taiz e Zeiger, 2004).

A concentração do elemento alumínio se mostrou semelhante, tanto nas plantas controle e tratadas com sal, quanto entre as duas variedades RB855536 e RB867515 ao longo do período de estresse salino, indicando que a absorção deste elemento não foi afetada pela salinidade. O alumínio em níveis elevados pode interferir com a movimentação do P, Ca e Mg nas plantas. O Al tóxico no solo inibe o crescimento e o desenvolvimento das raízes, alterando a absorção de água e nutrientes, e, por consequência, causa redução do desenvolvimento das plantas (Freitas *et al.*, 2006).

Os teores de boro não foram alterados significativamente pela salinidade nas duas variedades estudadas ao longo do período experimental. No entanto, os teores de boro na variedade RB867515 foram maiores aos 10 e 15 dias do início dos tratamentos para as plantas tratadas com sal, em comparação com a variedade RB855536. O boro está envolvido no alongamento celular, no metabolismo dos ácidos nucléicos, assim como é constituinte de complexos com manitol, ácido polimanurônico e outros constituintes da parede celular (Grattan e Grieve, 1999). O excesso de boro pode causar descoloração das folhas, necrose ou redução do crescimento da planta enquanto que a deficiência de boro pode interferir com processos de diferenciação celular, diminuição do crescimento das plantas e de produção de flores (Muntean, 2010).

Os teores de cobre não foram afetados pelo estresse salino nas duas variedades de cana-de-açúcar ao longo do período experimental. No entanto, os níveis de cobre na variedade RB867515 foram maiores para as plantas controles e tratadas com sal, em relação à variedade RB855536. No entanto a influência do estresse salino sobre a acumulação do cobre pode variar. Plantas de amaranto submetidas a estresse salino de 20 mM não demonstraram diferenças no conteúdo de cobre nas folhas (Costa *et al.*, 2008). Tunçturk *et al.* (2008) observaram acúmulos diferentes de cobre entre as 13 variedades de soja submetidas a estresse salino, onde em seis cultivares o conteúdo de cobre diminuiu e nas outras variedades o conteúdo de cobre aumentou. Plantas de girassol submetidas a diferentes concentrações de NaCl (0 a 600 mM) demonstraram diminuição do conteúdo de cobre nas folhas devido a salinidade (Achakzai *et al.*, 2010). Sendo assim, o acúmulo do cobre pode variar de acordo com a salinidade, o tempo de exposição assim como a espécie em estudo.

O acúmulo de ferro foi semelhante entre as plantas controle e as plantas tratadas com sal para as variedades RB855536 e RB867515. No entanto, ao comparar as duas variedades, a variedade RB867515 acumulou mais ferro aos 15 dias de estresse em comparação com a variedade RB855536. Da mesma forma que para os outros elementos, o ferro pode variar de acordo com a espécie e a salinidade. Vidal *et al.*, 2000, trabalhando com quatro espécies de plantas (fava-de-boi, sorgo, leucena e melosa) sob condições de estresse salino verificaram que não houve acúmulo significativo de ferro nas folhas das quatro espécies. Plantas de berinjela submetidas à salinidade de 0 a 137 mM de NaCl por 70 dias diminuiram os níveis de ferro com o aumento da salinidade (Bosco *et al.*, 2009).

O elemento manganês teve sua concentração aumentada nas plantas tratadas com sal em relação àquelas tratadas com água (controles) apenas aos 48 dias de estresse salino em ambas as variedades. Para a variedade tolerante, a concentração de manganês nas plantas tratadas com sal aumentou 60% em comparação com as plantas controle no dia 48. O mesmo efeito foi possível verificar para as plantas tratadas com sal da variedade RB855536, porém o aumento foi de 52%. O íon Mn^{2+} participa da ativação de várias enzimas, dentre elas as descarboxilases e desidrogenases que estão envolvidas no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) e também na reação fotossintética em que ocorre a quebra da molécula de água para a formação de oxigênio e prótons para a formação de ATP na membrana do tilacóide dos cloroplastos (Taiz e Zeiger, 2004). O manganês é componente do complexo protéico de cisão da água no fotossistema II (PSII) (Bondarava *et al.*, 2007).

No entanto, uma das funções mais importantes deste íon em plantas submetidas a estresse salino está na atuação juntamente com enzimas capazes de remover e detoxificar as plantas de compostos reativos de oxigênio (ROS). Dentre estas enzimas se encontra a dismutase do superóxido dependente de manganês (Mn-SOD) (Singh *et al.*, 2007) e proteínas do tipo *germin-like* que podem funcionar como proteínas SOD (Hurkman *et al.*, 1991), proteína esta discutida mais a frente no tópico proteômico.

A remoção de ROS das plantas torna-se importante uma vez que estes compostos são capazes de interagir com componentes das células (como proteínas e membranas) terminando por danificá-las e, dessa forma, acaba prejudicando o funcionamento de vários processos importantes do metabolismo.

A concentração de zinco basicamente se mostrou estável durante o tratamento, com exceção no 15º dia em que plantas controle de ambas as variedades que tiveram o conteúdo dobrado em relação a outros dias do período experimental. Alguns trabalhos na literatura confirmam que em algumas plantas e, dependendo do órgão, ocorre um aumento das concentrações de zinco devido à salinidade do solo (Tunçturk *et al.*, 2008; Bosco *et al.*, 2009). No entanto, este fato não explica o motivo das plantas controle terem apresentado maiores teores de zinco. No entanto, Nenova, 2008, ao testar a influência da solução salina de NaCl suplementada de ferro verificou que o aumento da salinidade interferiu com a absorção do elemento zinco tanto em folhas quanto em raízes devido à competição entre íons de mesma carga, no caso entre ferro e zinco. Porém, aqui ao observar a absorção deste elemento, a tendência seria que no 15º dia de estresse o teor desse elemento fosse o mesmo entre controle e tratamento salino, o que sugere um possível erro de análise pelo equipamento empregado na sua análise.

Em resumo, as variedades RB855536 e RB867515 mostraram diferenças significativas no acúmulo de nutrientes como fósforo, potássio, magnésio, manganês provocadas pela salinidade. Os nutrientes nitrogênio, cálcio, enxofre, alumínio, boro, cobre e ferro não mostraram diferenças em função da salinidade, no acúmulo pelas folhas de ambas as variedades. Entretanto, alguns nutrientes como enxofre, boro e ferro aumentaram suas concentrações nas plantas da variedade RB867515 em comparação com a variedade RB855536, mostrando uma maior robustez no acúmulo destes nutrientes pela planta. Sendo assim, a concentração dos nutrientes nas plantas pode variar com o tipo de estresse abiótico, assim como o período de exposição das plantas ao estresse e a espécie de planta em estudo.

A concentração de prolina na variedade sensível à seca, RB855536, apesar da tendência de aumento no dia 48, foi praticamente insignificante, uma vez que os valores são da ordem de 10^{-6} $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. Na variedade tolerante RB867515, houve uma diferença no teor de prolina entre a planta controle e a submetida ao estresse no final do experimento, apesar do aumento de 40% entre as plantas controle e plantas tratadas com sal, esta variação da produção também foi muito baixa. Apesar de baixa, esse aumento no teor de prolina na variedade RB867515 tratadas com sal possivelmente deve-se a algum ajuste osmótico realizado pelas células das folhas devido à salinidade.

Entretanto, ao comparar o acúmulo de prolina entre as variedades RB855536 e RB867515, esta última apresentou acúmulo em 40% a mais de prolina no final do período experimental nas plantas submetidas à salinidade. Fedina *et al.*, 2002 relataram a produção cerca de 180 a 1500 μmols de prolina por grama de folha em plantas de cevada submetidas a estresse salino. Khedr *et al.*, 2003, induziram plantas de *Pancratium maritimum* L. com estresse salino adicionado de prolina e verificaram que a produção deste aminoácido aumentou de 5 μmols para cerca de 15 e 25 μmols em estresse salino de 150 e 300 mM de NaCl, respectivamente. Summart *et al.*, 2010 observaram que o estresse salino de 250 mM induziu a produção de cerca de 2 a 2,5 vezes a mais de prolina em calos de arroz.

Em plantas de cana-de-açúcar, Rutherford, 1989, descreve um acúmulo de prolina de 5,5 μmol induzido por estresse hídrico utilizando polietileno glicol. Errabii *et al.*, 2006, verificaram a produção de prolina em ambas as variedades sensíveis e resistente a estresse hídrico por volta de 1,4 μmol de prolina em comparação a 0,2 μmol do controle. Em outro trabalho, Errabii *et al.*, 2007, constataram a produção de prolina nas variedades contrastantes de *Saccharum* spp (em comparação com as plantas controle) tanto em estresse osmótico induzido por manitol quanto por estresse induzido por NaCl. Em plantas transgênicas expressando o *gene P5CS* da via de produção da prolina, Molinari *et al.* (2007) ao induzirem estresse hídrico observaram que embora nas plantas do controle tenha ocorrido o acúmulo natural de prolina de 5 μmols , as plantas transformadas de cana-de-açúcar produziram 5x mais (25 μmols). Cha-Um e Kirdmanee, 2008 verificaram ao induzirem estresse osmótico de até 300 mM de manitol em plântulas, estas acumularam 2,236 $\mu\text{mols.g}^{-1}$ MF.

Estes resultados demonstram que existem plantas, inclusive de cana-de-açúcar, com a capacidade de produzir o aminoácido prolina naturalmente em grandes quantidades de acordo com a intensidade do estresse salino. A variedade RB855536

não acumulou prolina devido à salinidade. Em contrapartida, a variedade RB867515 acumulou quantidades significativas de prolina aos 48 dias de estresse nas plantas submetidas a estresse salino, demonstrando que esta variedade possa estar usando a prolina como um protetor osmótico.

O conteúdo de MDA para a variedade RB855536 mostrou um aumento significativo desde o início dos testes até 15 dias de estresse quando apresentou o maior aumento de produção de MDA (60%). Entre as plantas no dia 48 do controle e plantas tratadas com sal a peroxidação lipídica aumentou 50%. Já para a variedade RB867515 a peroxidação lipídica foi mais intensa somente aos 15 dias de estresse, onde pode-se notar uma diferença significativa entre as plantas do controle e as plantas tratadas com sal pelo sal de 70%. No dia 48 o MDA das plantas da variedade RB867515 tratadas com sal diminuiu e nas plantas controle aumentou. O estresse abiótico (salino, seca, oxidativo) ocasiona a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são capazes de oxidar lipídeos de membrana.

Até 15 dias de estresse, aparentemente houve uma resposta por parte da planta sensível a seca sobre a presença destes compostos reativos. Contudo, no dia 48 ocorreu uma ligeira queda da formação de MDA. Essa queda poderia ser devido à presença de enzimas detoxificantes agindo sob as ROS fazendo com que a célula recomece a voltar a suas atividades normais. Resultados adquiridos por meio de sequenciamento de proteínas demonstram a presença de proteínas com expressão aumentada em plantas estressadas com função de superóxido dismutase (SOD) em ambas as variedades no intuito de combater os ROS, no entanto, as plantas não conseguem resolver por completo.

Em contrapartida, a variedade RB867515 aparentou resistir melhor a salinidade até os dez primeiros dias de tratamento com NaCl, ocorrendo o pico na produção de complexos TBA-MDA no dia quinze, assim como para a variedade sensível, e, declinando logo em seguida no dia 48. Os dados obtidos para esta variedade se mostram da mesma forma para a variedade sensível, um dado interessante. Apesar de esta variedade ser dita como tolerante, ocorreu a produção de MDA, no entanto mais tardiamente e em uma proporção semelhante quando comparada com a variedade RB855536. Irigoyen *et al.*, 1992, também observaram um aumento do conteúdo de MDA em folhas de alfafa em resposta a estresse hídrico. Lutts *et al.*, 1996 verificaram que a alteração da permeabilidade das membranas de folhas de arroz estressadas com sal foi provocada pela presença de peroxidação lipídica.

Moradi e Ismail, 2007, observaram que sob diferentes níveis de estresse salino, arroz tolerante à salinidade produziram MDA em todos os níveis, no entanto sem diferenças estatísticas. Shao *et al.*, 2007 trabalhando com dez genótipos de trigo relataram que eles poderiam ser separados de acordo com a produção de enzimas anti-oxidantes e a produção de MDA em cada um dos três níveis de estresse salino (leve, moderado e severo). Nos três níveis, existiram genótipos que responderam à salinidade com uma maior ou menor produção de MDA. As variedades que demonstraram uma maior produção de MDA tiveram uma menor produção de enzimas anti-oxidantes (SOD, POD, CAT). Por outro lado, genótipos que mostraram uma maior produção de enzimas, a produção de MDA foi menor. Esses trabalhos evidenciam a importante atividade que enzimas antioxidantes em plantas perante as ações adversas do estresse salino, evidenciando claramente a adoção de diferentes formas da planta de se adaptar às condições de estresse hídrico do ambiente. Resultados obtidos na proteômica neste trabalho demonstram a presença de proteínas com função antioxidante (SOD), no entanto elas não foram suficientes para evitar a produção de MDA em ambas as variedades de cana-de-açúcar.

Em plantas de cana-de-açúcar, Jain *et al.*, 2010 estudando o estresse com zinco observaram uma tendência de aumento significativo do conteúdo de MDA nas folhas submetidas a diferentes níveis de estresse. Molinari *et al.* (2007) verificaram em plantas submetidas a estresse hídrico durante 12 dias um aumento do conteúdo de MDA em folhas de cana-de-açúcar, contudo, em comparação com o controle, essa produção foi menor nos dias 9 e 12 de estresse. Apesar de estas plantas estarem transformadas com o gene *P5CS*, a qual induz a produção de prolina, um aminoácido comumente relatado na literatura de estar envolvido com a tolerância de plantas ao estresse, foi possível observar a produção de MDA, indicando que a prolina em si não é suficiente para impedir a peroxidação lipídica devido ao estresse.

No geral, as plantas da variedade RB855536 apresentaram maior peroxidação de membranas lipídicas, evidenciado pelos níveis maiores de MDA, demonstrando que esta variedade foi menos tolerante ao estresse salino. Em contrapartida, a variedade RB867515 demonstrou um atraso na produção de MDA, acontecendo somente a partir do dia 15 de estresse. Estes resultados podem indicar que a variedade RB855536 possa ser mais sensível ao estresse e a variedade RB867515 possa tolerar mais o estresse hídrico e o salino devido a alguns mecanismos de tolerância como a produção de prolina, produção de enzimas detoxicantes, por exemplo, a SOD, e o aumento do comprimento das raízes.

Na análise inicial utilizando a eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) não foram observadas diferenças quantitativas entre as amostras submetidas a estresse salino em comparação as amostras controle. Isso se deve à complexidade do perfil protéico do material e à baixa eficiência da resolução dos géis unidimensionais (Graves e Haystead, 2002). Dessa forma, tornou-se necessária a análise protéica por meio de géis bidimensionais para uma melhor separação e, conseqüentemente, uma melhor visualização e comparação das proteínas expressas em folhas de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino e em folhas de plantas controle tratadas com água.

Duas variedades de cana-de-açúcar contrastantes a estresse hídrico foram analisadas por meio da proteômica em *strips* de 13 cm em uma faixa de pI reduzida entre 4 a 7 (Jangpromma *et al.*, 2007) para separação das mesmas na focalização isoelétrica (primeira dimensão) no intuito de verificar a produção de proteínas que respondessem ao estresse. Ao utilizar esta estreita faixa de pI, este estudo excluiu várias proteínas que poderiam estar relacionadas a algum mecanismo de proteção ou resistência às condições de estresse aplicadas as plantas de cana-de-açúcar. No presente trabalho, a utilização de *strips* com pI 3 a 11 incluíram proteínas tanto mais ácidas quanto básicas. Dessa forma, o presente estudo analisou um padrão protéico mais global, sendo importante para uma melhor compreensão da expressão de proteínas em condições de estresse salino.

As seqüências dos EST's (*Expressed sequence tags*), fragmentos de genes que foram copiados de DNA para RNA, fornecem evidência de genes que são expressos e suas estruturas em relação a quais partes são exons. O objetivo do *The Gene Index Project (Gene Index)* é utilizar os EST's e genes disponíveis e fornecer um inventário dos genes prováveis e suas variantes e anotar essas informações relativas ao papel funcional desempenhado por estes genes e seus produtos. Além disso, os catálogos podem ser utilizados para encontrar ligações entre genes e vias metabólicas em diferentes espécies e fornecer listas de recursos dentro de genomas concluídos que podem auxiliar na compreensão de como a expressão dos genes é regulada (G.I.P., 2010).

O Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (*National Center for Biotechnology-NCBI*) é parte da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos, (*National Library of Medicine-NLM*), uma filial do Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health-NIH*). O NCBI está localizado em Bethesda, Maryland e foi fundado em 1988 por meio da legislação patrocinada pelo senador Claude Pepper. O NCBI

reúne dados de sequências do genoma no *GenBank* e um índice de artigos de pesquisa biomédica no *PubMed Central* e no *PubMed*, bem como outras informações relevantes para a biotecnologia. Todos estes dados estão disponíveis online através do *Entrez* motor de busca. Atualmente o NCBI é dirigido por David Lipman, um dos autores originais do *BLAST*, programa de alinhamento de sequências de DNA, RNA e proteína (N.C.B.I., 2010). Dessa forma, o *Gene Index* e o NCBI reúnem informações sobre o genoma e o proteoma de várias espécies, incluindo cana-de-açúcar.

Proteínas do metabolismo energético

A enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase (EC 4.1.2.13) (FBP aldolase), encontrada apenas nos géis de folhas da variedade RB867515 em plantas controle tratadas com água com diminuição da expressão no *spot* s1 e em duas isoformas nos *spots* s6 e s7 (proteínas controle), é uma enzima chave do metabolismo energético, catalisando a reação de clivagem do composto D-frutose-1,6-bifosfato em D-gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato na glicólise, além da reação reversa na via da gliconeogênese. Resultados diferentes foram obtidos por Salekdeh *et al.*, 2002a, que observaram que esta enzima aumentou sua expressão em cerca de 40% em folhas de arroz submetidas ao estresse salino. Abbasi e Komatsu (2004) observaram o aumento da expressão da FBP aldolase, inclusive sob diferentes tipos de estresse, como frio, salinidade, seca e sob a presença de hormônio ABA, indicando que a planta respondeu aos estímulos provocados pelo estresse super expressando esta enzima. É interessante notar que esta enzima estava presente em três diferentes massas e pls demonstrando que estas possivelmente passaram por processos pós-traducionais, como fosforilações e glicosilações. Resultado similar foi adquirido por Iwata *et al.*, 1998, que observaram a presença de isoformas em diferentes pls e massas. Em análises de proteoma de raiz de grama (*Agrostis* sp.) submetida a estresse de temperatura, duas isoformas de FBP aldolase aumentaram a expressão devido ao estresse (Xu e Huang, 2008).

Outra enzima importante na via do metabolismo energético detectada na variedade RB867515 foi a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12), encontrada com expressão aumentada no *spot* s4 e uma exclusiva das plantas submetidas à salinidade no *spot* s13. Esta enzima pertence à família das desidrogenases e catalisa a reação de oxidação do gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-

bifosfoglicerato, na via glicolítica, um composto de fosfato de alta energia. Neste passo da glicólise ocorre a produção de compostos energéticos, como o ATP. Ela também existe no núcleo e possui um importante papel na transcrição de genes, replicação do DNA, reparação do DNA e exportação de RNA (Hara *et al.*, 2006). Segundo Yang *et al.* (2009) o aumento da expressão desta enzima da via glicolítica é de suma importância para o aumento do acúmulo de açúcares necessários assim como o fornecimento de mais energia para a planta, sendo assim, um indicativo de tolerância ao estresse. Estas proteínas observadas na variedade RB867515, indicando que esta proteína possa estar envolvida em algum mecanismo de tolerância ao estresse salino.

Caruso *et al.* (2008) relatam que plantas sobre estresse salino diminuem suas taxas do metabolismo energético para a conservação de energia, sendo assim, limitam também a produção de ROS. Ao contrário destes resultados, as proteínas identificadas neste trabalho revelaram que, na presença de salinidade, houve um aumento da expressão. Essa divergência entre os resultados da literatura e os resultados obtidos neste trabalho induz à conclusão de que a diminuição ou o aumento da expressão de proteínas envolvidas com os processos do metabolismo energético pode variar de espécie a espécie e dos mecanismos de defesa adotados pelas plantas para enfrentar a salinidade.

O fato de terem sido encontradas enzimas diferentes da via glicolítica aumentando sua expressão suporta a idéia de que esta via metabólica é afetada pela salinidade. O aumento de proteínas da via glicolítica, como a gliceraldeído 3-P desidrogenase, poderia dar continuidade ao fluxo de carbono pelo ciclo de Calvin e encaminhar a um aumento na produção de sacarose e aminoácidos pelo aumento do fluxo de carbono na glicólise (Tada e Kashimura, 2009) e contribuir para a tolerância ao estresse.

Além disso, a redundância de proteínas, como frutose 1,6 bifosfato aldolase e a gliceraldeído 3-P desidrogenase é um indicativo de presença de produtos gênicos com diferentes isoformas, incluindo processos de modificações pós-traducionais ou esta pode ser composta por um conjunto de dois ou mais *loci* com sequencias similares de DNA (família gênica).

Proteínas *germin-like*

Descrita pela primeira vez em sementes de trigo, a proteína *germin* foi descoberta em estudos que buscavam identificar a proteína responsável pela germinação nesta espécie (Thomson e Lane, 1980). Todas as *germin* possuem um motivo característico que se dobra formando uma estrutura enrolada de barris- β envolvidas em ligação com metal (Requena e Bornemann, 1999; Dunwell *et al.*, 2008). Várias proteínas contendo o motivo protéico de *germin* (50% de identidade) foram encontradas em outras plantas e, sendo assim, foram nomeadas como *germin-like proteins* (GLPs) (Thomson e Lane, 1980; Dumas *et al.*, 1993). A maioria das GLPs possui características bioquímicas semelhantes tais como resistência ao calor extremo e a reagentes desnaturantes, formação de homopolímeros, glicosilação e localização na membrana celular. No entanto, elas diferem com relação à especificidade em tecidos e atividades enzimáticas (Vallelian-Bindschedler *et al.*, 1998; Schweizer *et al.*, 1999; Woo *et al.*, 2000; Rodriguez-Lopez *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004).

As funções das GLPs podem variar de receptores do hormônio auxina (Ohmiya *et al.*, 1998), sensores de luz (Ono *et al.*, 1996), expansão celular (Harmer *et al.*, 2000); proteínas estruturais de resistência que se tornam insolúveis devido a estresse induzido por calor e proteção contra herbivoria (Bernier e Berna, 2001) e proteínas com função de enzimas oxalato oxidase (OxO) e superóxido dismutase (SOD) (Davidson *et al.*, 2009).

A proteína *germin-like* (GLP) foi encontrada na variedade RB867515 com expressão aumentada com a salinidade no *spot* s8 e outras duas isoformas nos *spots* s16 e s17 (proteínas controle). Apesar de terem variado muito pouco em massa molecular, as GLPs identificadas neste trabalho variaram bastante em termos de ponto isoelétrico (pI). Resultado semelhante foi encontrado por Hurkman *et al.* (1991) ao estudarem GLPs que aumentaram em raízes de cevada durante o estresse salino nos pI de 6,3 e 6,5 com massa molecular de 26 kDa e no pI 6,5 com massa molecular de 27 kDa.

Um ponto interessante verificado por Stepien e Klobus, 2005 foram as diferenças de produção de enzimas antioxidantes em plantas de metabolismo C₃, como o trigo e C₄, como milho. Eles observaram que as duas plantas produziram enzimas antioxidantes. Entretanto, as plantas de trigo não atingiram os níveis altíssimos de atividades antioxidantes obtidas pelas plantas de milho. Eles atribuem esse elevado nível a uma vantagem das plantas com metabolismo C₄ a resistirem aos

danos causados pelo estresse sem a necessidade de uma indução adicional de enzimas SOD, requerida pelas plantas C₃. A produção de enzimas detoxificantes poderia ser um dos mecanismos estratégicos que levariam a variedade RB867515 dita como tolerante a resistir melhor às condições adversas do estresse salino. No entanto, não foi o caso nos experimentos aqui realizados.

Dentre as proteínas sequenciadas para a variedade RB855536, duas isoformas de GLPs tiveram sua expressão aumentada com a salinidade nos *spots* s24 e s25. Assim como para a variedade RB867515, as duas GLPs variaram somente em pls, permanecendo com massas moleculares semelhantes. Modificações pós-traducionais tais como glicosilações, fosforilações e metilações podem induzir a mudança da massa molecular e/ou da carga total da proteína (Jiang *et al.*, 2007) ou então estas variações podem ser devidas à presença de uma família gênica. Este fenômeno pode explicar a presença de uma mesma proteína em diferentes massas moleculares e pl observada nos géis bidimensionais.

A identificação de proteínas *germin-like* nas variedades RB855536 e RB867515 que possuem íons manganês em sua estrutura se torna interessante uma vez que ficou evidenciado neste estudo o aumento dos íons de manganês em plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino no último dia dos experimentos para ambas as variedades. Da mesma maneira observada para a variedade RB867515, as GLPs identificadas para a variedade RB855536 poderiam exercer a função de enzima detoxificante Mn-SOD, uma vez que foi possível averiguar um aumento da concentração de íons de Mn no último dia de experimento. Futuros testes devem ser conduzidos para verificar essa possível hipótese.

É importante ressaltar que as plantas de cana-de-açúcar reagiram à salinidade com o aumento de MDA, com o pico da produção no dia 15 e em seguida ocorreu um declínio em ambas as variedades. Neste período de recuo da produção de MDA observada no final do período experimental, as GLPs identificadas neste trabalho com uma possível atividade de Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD) poderiam estar agindo na remoção dos compostos de ROS, induzindo a uma diminuição da peroxidação lipídica. A diminuição da peroxidação de lipídios de membrana ocasionada pela possível atividade de Mn-SOD poderia levar a planta a continuar com suas atividades fisiológicas normais, o que ficou evidenciado pelo aumento de proteínas chave dos processos de formação de energia e de açúcares, corroborando resultados obtidos no tópico acima onde foi discutido o aumento de enzimas do metabolismo energético. No

entanto, seriam necessários testes específicos para a reação de Mn-SOD para averiguar esta hipótese.

Proteínas envolvidas na fotossíntese

Uma proteína que não demonstrou alteração, utilizada como proteína controle na variedade RB867515, encontrada no *spot* s3, corresponde à enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (EC 4.1.1.39). Esta enzima está presente no primeiro passo da fixação do carbono no ciclo de Calvin, onde ela catalisa a reação de oxidação de uma molécula de ribulose 1,5-bifosfato com uma molécula de dióxido de carbono e outra de água para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato, que inicia o ciclo de Calvin. Razavizadeh *et al.*, 2009 verificaram que em folhas de tabaco, algumas Rubiscos em questão de subunidade maior não alteraram sua expressão quando submetidas 150 mM de NaCl por dois dias, representando um resultado semelhante aos obtidos neste trabalho, entretanto, estas subunidades tiveram uma diminuição significativa após quatro dias de exposição à salinidade. No entanto, no mesmo estudo os autores observaram um aumento da subunidade menor da Rubisco. Eles demonstram que plantas de tabaco, como glicófitas, conseguem sobreviver e continuar a fotossintetizar em níveis moderados de estresse salino. Este resultado foi observado também por Zörb *et al.*, 2004, em plantas de milho sob estresse salino. Assim como para outras enzimas encontradas no metabolismo, a Rubisco está sujeita tanto ao aumento como a diminuição da expressão diante da salinidade, havendo variações entre espécies.

Outras duas proteínas identificada neste trabalho na variedade RB867515 foram os polipeptídios de 23 kDa do fotossistema II (PSII) (duas isoformas presentes nos *spots* s14 e s15). Embora não houvesse alterações em sua expressão, estas proteínas também utilizam o íon manganês como co-fatores para suas atividades. Esta proteína catalisa a reação de oxidação da molécula de água e a redução da proteína plastoquinona no início do processo de fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2004).

É importante ressaltar que a ausência de alteração da expressão das proteínas 23 kDa do PSII corrobora os resultados de fluorescência da clorofila *a*, onde as plantas de cana-de-açúcar não demonstraram alterações significantes no comportamento do fluxo de elétrons durante todo o período de estresse salino.

Proteínas produtoras de ATP

Uma proteína que não apresentou diferenças em relação à expressão na variedade RB867515 foi a enzima ATP sintase CF1 subunidade alfa (*spot s2*). Krepes *et al.*, 2002 ao submeterem plantas de *Arabidopsis* a diferentes concentrações de cloreto de sódio não observaram alterações da expressão desta enzima.

Apesar de não observar alterações na expressão da subunidade alfa da ATP sintase na variedade RB867515, para a variedade RB855536 aconteceu um aumento da expressão da subunidade beta da enzima ATP (*spot s19*). Trabalhos na literatura relatam que essa proteína pode tanto aumentar sua expressão em condição de estresse salino em plantas como arroz e batata (Parker *et al.*, 2006; Aghaei *et al.*, 2008) como também podem diminuir sob estresse salino em plantas como a briófitas *Physcomitrella patens* e tabaco (Wang *et al.*, 2008; Razavizadeh *et al.*, 2009), indicativo de que a resposta desta proteína à salinidade varia de espécie para espécie e do tipo e intensidade do estresse. O aumento da síntese da ATP sintase pode refletir requerimentos de processos como mecanismos de transporte secundário (Parker *et al.*, 2006).

Proteínas Chaperonas

As chaperonas moleculares são componentes-chave que contribuem para a homeostase celular sob condições normais e adversas de crescimento. Elas são responsáveis pelo dobramento de proteínas, translocação e degradação em processos normais da célula, funcionando como estabilizadores de proteínas e de membranas e podem ajudar proteínas a se reenovelarem devido a condições de estresse. Uma gama de proteínas tem sido relatada por realizar atividades de chaperona. A maioria das chaperonas moleculares são proteínas de estresse e muitas delas foram identificadas como *heat-shock proteins* (HSPs) (Lindquist, 1986; Lindquist e Craig, 1988). Existem pelo menos cinco tipos de famílias de HSPs identificados de acordo com suas funções, localização na célula e tamanhos: a família das pequenas HSPs (sHSPs), família HSP100, família HSP90, chaperoninas GroEl e HSP60, e a família HSP70 (Wang *et al.*, 2004).

A proteína do *spot s9* a qual está presente somente nos géis que receberam água salina da variedade RB867515 foi identificada como sendo uma HSP da família

70 (HSP70). Aghaei *et al.* (2008) investigando o comportamento de duas variedades contrastantes de batata verificaram que a produção de HSPs aumentou em plantas de batata tolerantes a estresse salino. Eles concluíram que essa proteína poderia ser considerada um dos mecanismos que pode conferir tolerância ao estresse salino na cultivar tolerante.

Em plantas de uva, Grimplet *et al.*, 2009, evidenciaram a produção de HSP60 sob estresse hídrico. Estudos prévios feitos por Giribaldi *et al.*, 2007, identificaram a produção de HSP70 em uvas durante a colheita, o que pode ser considerado um tipo de estresse. A expressão de proteínas de estresse pode variar de acordo com a intensidade do estresse salino. Sengupta e Majumder, 2009, verificaram que as plantas de arroz somente produziram proteínas de estresse em uma salinidade de 400 mM de NaCl. As plantas de arroz utilizadas no trabalho destes autores são plantas halófitas selvagens. Plantas halófitas são conhecidas pela resistência a ambientes com salinidade alta, dessa forma, a produção de HSPs sob condições de alta salinidade não foi uma surpresa. Um resultado interessante foi obtido por Razavizadeh *et al.* (2009) ao realizarem uma análise proteômica de folhas de tabaco. Eles verificaram que as plantas controle e as plantas submetidas a três diferentes intensidades de estresse salino produziram as HSPs. No entanto, eles observaram que ao invés das HSP aumentarem sua expressão conforme a exposição ao estresse, estas na verdade diminuíram sua expressão. Resultado semelhante foi obtido previamente por Kieffer *et al.*, 2008, com folhas de *Populus* spp. submetidas a estresse por cádmio. Esses autores ressaltam que a resposta destas HSPs pode variar tanto pelo tipo de estresse que as plantas estão sujeitas como também a variação existente de espécie para espécie.

Em plantas de cana-de-açúcar já foram reportadas a produção de HSP da família das *small* HSPs (sHSP). Tiroli e Ramos, 2007, identificaram sHSPs das classes 1 em plantas de *Saccharum* devido a estresse de alta temperatura utilizando *ESTs* de cana-de-açúcar. Resultado semelhante foi obtido por Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010, onde eles verificaram que altas temperaturas induziram a agregação de proteínas de cana-de-açúcar. Conforme a exposição às altas temperaturas, as plantas de cana-de-açúcar induziram a expressão de sHSP da classe 1 que aumentaram a atividade de chaperonas nas células que funcionam para auxiliar as proteínas a voltarem a suas conformações normais, bem como no enovelamento correto de novas proteínas recém sintetizadas.

Rodrigues *et al.*, 2009, apesar de não terem utilizado a ferramenta da proteômica e sim *ESTs*, observaram o aumento de três tipos de HSP (classe 1 das sHSPs, família HSP70 e família HSP100) ao submeterem cultivares brasileiros de *Saccharum* spp. tolerantes e sensíveis a estresse hídrico. Essa expressão de HSP aconteceu principalmente em plantas tolerantes, demonstrando que estas proteínas estão diretamente ligadas tanto às proteínas expressas em condições de seca assim como uma tolerância desta cultivar à estresse hídrico. Todos os trabalhos na literatura destacam a importância das HSPs no processo de resistência ou tolerância aos estresses abióticos (Wang *et al.*, 2004). Esta proteína induz as plantas a continuarem com suas atividades fisiológicas normais por ser tratar de uma proteína que auxilia no dobramento e no reenovelamento correto de outras proteínas que possam estar envolvidas em processos importantes em vias metabólicas como, por exemplo, as vias de metabolismo energético.

Apesar da existência de trabalhos utilizando cultivares brasileiros de cana-de-açúcar, o presente trabalho relata pela primeira vez a existência de HSPs da família 70 induzidas por estresse salino utilizando uma abordagem proteômica, demonstrando a importância destas proteínas em um possível processo de proteção da variedade RB867515 ao estresse salino.

11. Considerações finais

A proteômica de plantas sob estresses abióticos (p. ex. salino) é uma poderosa ferramenta para o estudo e entendimento do comportamento da expressão gênica em resposta ao estresse. Apesar disso, as análises por eletroforese bidimensional possuem suas limitações. Uma das limitações da técnica de análise proteômica utilizando géis bidimensionais é que proteínas de baixa expressão, mesmo tendo a expressão alterada pelo estresse salino, não são detectadas. Além disso, proteínas com pl extremos (muito ácidas ou muito básicas) também são excluídas, o que limita as análises proteômicas (Quirino *et al.*, 2010).

Um dos principais problemas enfrentados neste trabalho foi a identificação por meio de digestão das proteínas *in gel*. Apesar de terem sido sequenciadas 65% das proteínas selecionadas (13 de 20) com mudança na expressão para a variedade RB867515, na variedade RB855536 esta porcentagem foi de apenas 20% (5 de 25). Procedimentos como desidratação dos pedaços de géis seguida de hidratação com a solução de bicarbonato de amônio ou a duração da digestão (24h) poderiam ter ocasionado o baixo rendimento da digestão.

Entretanto, apesar dos problemas enfrentados, o presente trabalho foi pioneiro em contrastar as características fisiológicas e correlacioná-las com a expressão proteica as duas variedades RB855536 e RB867515 de cana-de-açúcar contrastantes a estresse hídrico ao serem submetidas a estresse salino. Para a maioria dos testes fisiológicos, como fotossíntese e fluorescência da clorofila *a*, as plantas controle da variedade RB867515 possuíram melhores desempenhos em relação à variedade RB855536. Este desempenho melhor pode ser devido, também, à capacidade da variedade RB867515 de distribuir melhor suas raízes verticalmente e lateralmente, uma vez que ficou evidenciada uma maior massa de raízes nesta variedade. Nos testes bioquímicos de macro e micronutrientes, o acúmulo da maioria destes nutrientes foi maior nas plantas da variedade RB867515, indicando uma maior robustez desta variedade na absorção de nutrientes. O acúmulo de prolina foliar foi maior em plantas submetidas ao estresse salino na variedade RB867515 e a produção de MDA nesta variedade foi tardia, somente ocorrendo no dia 15 após o início do

estresse salino, indicando que a variedade RB867515 apresenta maior tolerância às condições de salinidade.

Na proteômica, duas proteínas sequenciadas podem estar diretamente relacionadas à resposta da planta ao estresse salino, complementando os resultados observados em testes fisiológicos e bioquímicos, sendo estas *germin-like proteins* (GLPs), encontradas com expressão aumentada tanto na variedade RB855536 quanto na variedade RB867515 e *heat-shock protein* (HSP) encontrada somente na variedade RB867515 nas plantas tratadas com sal. Esta última proteína está estritamente relacionada com proteínas que respondem diretamente a diferentes tipos de estresse (Sung *et al.*, 2001) e em especial o estresse salino (Kim *et al.*, 2005; Askari *et al.*, 2006; Yang, Xiao *et al.*, 2009).

Em resumo, as observações em campo do desempenho das variedades RB855536 e RB867515 em relação a estresse hídrico possivelmente podem ser semelhantes ao submeterem estas mesmas variedades à estresse salino. Sendo assim, a variedade RB867515 poderia ser indicada para ambientes onde o processo de salinidade no solo esteja ocorrendo.

12. Referências Bibliográficas

- Abbasi, F. M. e Komatsu, S. 2004. **A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath.** *Proteomics*, v.4, n.7, p.2072-2081.
- Achakzai, A. K. K.; Kayani, S. A. e Hanif, A. 2010. **Effect of salinity on uptake of micronutrients in sunflower at early vegetative stage.** *Pakistan Journal of Botany*, v.42, n.1, p.129-139.
- Aghaei, K.; Ehsanpour, A. A. e Komatsu, S. 2008. **Proteomic analysis of potato under salt stress.** *Journal of Proteome Research*, v.7, p.4858-4868.
- Alexander, D.; Goodman, R. M.; Gut-Rella, M.; Glascock, C.; Weymann, K.; Friedrich, L.; Maddox, D.; Ahl-Goy, P.; Luntz, T.; Ward, E. e Ryals, J. 1993. **Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.90, p.7327-7331.
- Allakhverdiev, S. I.; Sakamoto, A.; Nishiyama, Y.; Inaba, M. e Murata, N. 2000. **Ionic and osmotic effects of NaCl-induced in activation of photo systems I and II in *Synechococcus* sp.** *Plant Physiology*, v.123, p.1047-1056.
- Alvin, F. C.; Carolino, S. M. B.; Cascardo, J. C. M.; Nunes, C. C.; Martinez, C. A.; Otoni, W. C. e Fontes, E. P. B. 2001. **Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress.** *Plant Physiology*, v.126, p.1042-1054.
- Amorim, J. R. A. D. Salinidade em áreas irrigadas: origem do problema, consequências e possíveis soluções AGROSOFT BRASIL 2009.
- Aragao, F. J. L. e Faria, J. C. 2009. **First transgenic geminivirus-resistant plant in the field.** *Nature Biotechnology*, v.27, n.12, p.1086-1088.
- Ashraf, M. e Foolad, M. R. 2007. **Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance.** *Environmental and Experimental Botany*, v.59, n.2, p.206-216.
- Askari, H.; Edqvist, J.; Hajheidari, M.; Kafi, M. e Salekdeh, G. H. 2006. **Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves.** *Proteomics*, v.6, p.2542-2554.
- Azevedo Neto, A. D. D. e Tabosa, J. N. 2000. **Estresse salino em plântulas de milho: Parte II Distribuição dos macronutrientes catiônicos e suas relações com sódio.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.4, n.2, p.165-171.

Bates, L. S.; Waldren, R. P. e Teare, I. D. 1973. **Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies.** *Plant and Soil*, v.39, n.1, p.205-207.

Bernier, F. e Berna, A. 2001. **Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly?** *Plant Physiology and Biochemistry*, v.39, n.7-8, p.545-554.

Blanco, F. F. e Folegatti, M. V. 2008. **Doses de N e K no tomateiro sob estresse salino: III. Produção e qualidade de frutos.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.12, p.122-127.

Blumwald, E.; Aharon, G. S. e Apse, M. P. 2000. **Sodium transport in plant cells.** *Biochemica et Biophysica Acta*, v.1465, p.140-151.

Bondarava, N.; Una, S. e Krieger-Liszkay, N. 2007. **Manganese binding to the 23 kDa extrinsic protein of Photosystem II.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1767, p.583-588.

Borba, M. M. Z. e Bazzo, A. M. Estudo Econômico Do Ciclo Produtivo Da Cana-De-Açúcar Para Reforma De Canavial, Em Área De Fornecedor Do Estado De São Paulo. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Porto Alegre. 2009

Borba, P. S. Aproveitamento de bagaço e palha de cana de açúcar na indústria sucroalcoeira. (Monografia). Instituto IDEAL, Santa Catarina, 2008. 16 p.

Borges, J. C.; Peroto, M. C. e Ramos, C. H. I. 2001. **Molecular chaperone genes in the sugarcane expressed sequence database (SUCEST).** *Genetics and Molecular Biology*, v.24, n.1-4, p.85-92. 10.1590/S1415-47572001000100013

Borkird, C.; Simoens, C.; Villarroel, R. e Van Montagu, M. 1991. **Gene expression associated with water stress adaptation of rice cells and identification to two genes as hsp 70 and ubiquitin.** *Physiologia Plantarum*, v.82, p.449-457.

Bosco, M. R. D. O.; Oliveira, A. B. D.; Hernandez, F. F. F. e Lacerda, C. F. D. 2009. **Influência do estresse salino na composição mineral da berinjela.** *Revista Ciência Agronômica*, v.40, n.2, p.157-164.

Bostock, R. M. e Quatrano, R. S. 1992. **Regulation of Em Gene-Expression in Rice - Interaction between Osmotic-Stress and Absciscic-Acid.** *Plant Physiology*, v.98, n.4, p.1356-1363.

Bower, R. e Birch, R. G. 1992. **Transgenic Sugarcane Plants Via Microprojectile Bombardment.** *Plant Journal*, v.2, n.3, p.409-416.

Cambraia, J.; Silva, M. A. D.; Cano, M. A. O. e Sant'anna, R. 1991. **Método simples para a avaliação de cultivares de sorgo quanto a tolerância ao alumínio.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.3, n.2, p.87-95.

Caruso, G.; Cavaliere, C.; Guarino, C.; Gubbiotti, R.; Foglia, P. e Lagana, A. 2008. **Identification of changes in Triticum durum L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.391, n.1, p.381-390.

Cha-Um, S. e Kirdmanee, C. 2008. **Effect of osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth of sugarcane plantlets (*Saccharum officinarum* L.).** *Pakistan Journal of Botany*, v.40, n.6, p.2541-2552.

Conab. 2009. **Companhia Nacional de Abastecimento** <http://www.conab.gov.br/conabweb/> Acessado em 15/03/2010.

Coplana. 2007. **Censo Varietal.** http://www.google.com/url?sa=t&source=web&cd=1&ved=0CBUQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.coplana.com%2Fgxfiles%2Fws001%2Fdesign%2FRevistaCoplana%2F2006%2FSetembro%2Fpag02.pdf&rct=j&q=Revista%20Coplana%20-%20Setembro%202007&ei=lrk3TInECC2ruAeVp6mhBA&usq=AFQjCNGVksch2nz_kMnSh_wAyeA2WA3IRA. Acessado em 09/07/2010

Costa, D. M. A. D.; Melo, H. N. D. S. e Ferreira, S. R. 2008. **Composição química da solução de solo após cultivo sob estresse salino e cobertura morta.** *Holos*, v.1, p.4-14.

D'Hont, A. 2005. **Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana.** *Cytogenetics and Genome Research*, v.109, p.27-33.

D'hont, A. e Glaszman, J. C. 2001. **Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research.** *Proceedings of the International Society for Sugar Cane Technology*, v.24, p.556-559.

Davidson, R. M.; Reeves, P. A.; Manosalva, P. M. e Leach, J. E. 2009. **Germis: A diverse protein family important for crop improvement.** *Plant Science*, v.177, p.499-510.

Dechen, A. R. e Nachtigall, R. G. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: Novais, R. F., Alvarez, V. H., et al (Ed.). Fertilidade do solo. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira do Solo, 2007. Elementos requeridos à nutrição de plantas, p.91-132

Dias, N. S. Manejo da fertirrigação e controle da salinidade em solo cultivado com melão rendilhado sob ambiente protegido. (Doutorado). Irrigação e Drenagem, ESAUQ/USP, São Paulo, 2004. 110 p.

Dombrowski, J. E. 2003. **Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants.** *Plant Physiology*, v.132, n.4, p.2098-2107.

Dooki, A. D.; Mayer-Posner, F. J.; Askari, H.; Zaiee, A. A. e Salekdeh, G. H. 2006. **Proteomic responses of rice young panicles to salinity.** *Proteomics*, v.6, n.24, p.6498-6507.

Dubley, H. e Grover, A. 2001. **Current initiatives in proteomics research: The plant perspective.** *Plant Molecular Biology*, v.80, n.2, p.262-269.

Dumas, B.; Sailland, A.; Cheviet, J. P.; Freyssinet, G. e Pallett, K. 1993. **Identification of barley oxalate oxidase as a germin-like protein.** *Comptes rendus de l'Academie des sciences*, v.316, p.793-798.

Dunwell, J. M.; Gibbings, J. G.; Mahmood, T. e Naqvi, S. M. S. 2008. **Germin and germin-like proteins: evolution, structure, and function.** *Critical Review of Plant Science*, v.27, p.342-375.

Enríquez-Obregón, G. A.; Vázquez-Padrón, R. I.; Prieto-Samsónov, D. L.; Perez, M. e Selman-Houssein, G. 1997. **Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds.** *Biotecnología Aplicada*, v.14, p.169-174.

Ericson, M. C. e Alfinito, S. H. 1984. **Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture** *Plant Physiology*, v.74, p.506-509.

Errabii, T.; Gandonou, C. B. e Essalmani, H. 2007. **Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures.** *Acta Physiologiae Plantarum*, v.29, p.95-102.

Errabii, T.; Gandonou, C. B.; Essalmani, H.; Abrini, J.; Idaomar, M. e Skali-Senhaji, N. 2006. **Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief.** *African Journal of Biotechnology*, v.5, n.16, p.1488-1493.

Esteves, B. D. S. e Suzuki, M. S. 2008. **Efeito da salinidade sobre as plantas.** *Oecologia Brasiliensis*, v.12, n.4, p.662-679.

Fageria, N. K. e Gheyi, H. R. Melhoria genética das culturas e seleção de cultivares. In: Gheyi, H. R., Queiroz, J. E., *et al* (Ed.). Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. Campina Grande: UFPB-SBEA, 1997. Melhoria genética das culturas e seleção de cultivares., p.363-383

Falco, M. C.; Tulmann Neto, A. e Ulian, E. C. 2000. **Transformation and expression of a gene for herbicide-resistance in Brazilian sugarcane.** *Plant Cell Reports*, v.19, p.1188-1194.

Fallon, K. M. e Phillips, R. 1989. **Responses to Water-Stress in Adapted and Unadapted Carrot Cell-Suspension Cultures.** *Journal of Experimental Botany*, v.40, n.215, p.681-687.

Falqueto, A. R.; Cassol, D.; Júnior, A. M. D. M.; Oliveira, A. C. D. e Bacarin, M. A. 2007. **Características da Fluorescência da Clorofila em Cultivares de Arroz Com Ciclo Precoce, Médio e Tardio.** *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, n.2, p.579-581.

Fao. 2009. **FAOSTAT** <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
Acessado em 11/03/2010

Fao. 2010. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**
http://www.fao.org/corp/google_result/en/?cx=0181706201437011049333%3Aqq82jsfba7w&q=land+salinization&x=0&y=0&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2F#982
Acessado em 15/03/10

Farias, C. H. D. A.; Fernandes, P. D.; Azevedo, H. M. e Neto, J. D. 2008. **Índices de crescimento da cana-de-açúcar irrigada e de sequeiro no Estado da Paraíba.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.12, n.4, p.356-362.

Fedina, I. S.; Georgieva, K. e Grigorova, I. 2002. **Light-Dark Changes in Proline Content of Barley Leaves under Salt Stress**. *Biologia Plantarum*, v.45, n.1, p.59-63.

Figueirêdo, A. F. R. Análise do risco de salinização dos solos da bacia hidrográfica do rio colônia – sul da Bahia. (Mestrado). Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2005. 84 p.

Freitas, F. A.; Kopp, M. M.; Sousa, R. O.; Zimmer, P. D.; Carvalho, F. I. F. e Oliveira, A. C. 2006. **Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos**. *Ciência Rural*, v.36, n.1, p.72-79.

G.I.P. 2010. **The Gene Index Project**. <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/> 12/07/2010

Garcia, G. D. O.; Ferreira, P. A.; Miranda, G. V.; Neves, J. C. L.; Moraes, W. B. e Santos, D. B. D. 2007. **Teores foliares dos macronutrientes catiônicos e suas relações com o sódio em plantas de milho sob estresse salino**. *IDESIA*, v.25, n.3, p.93-106.

Genard, H.; Le Saos, J.; Hillard, J.; Tremolieres, A. e Boucaud, J. 1991. **Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima***. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.29, p.421-427.

Giribaldi, M.; Perugini, I.; Sauvage, F. e Schubert, A. 2007. **Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF**. *Proteomics*, v.7, n.17, p.3154-3170.

Grattan, S. R. e Grieve, C. M. 1999. **Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops**. *Scientia Horticulturae*, v.78, p.127-157.

Graves, P. R. e Haystead, T. A. J. 2002. **Molecular Biologist's Guide to Proteomics**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.66, n.1, p.39-63.

Grimplet, J.; Wheatley, M.; Jouira, H.; Deluc, L.; Cramer, G. e Cushman, J. 2009. **Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well-watered and water-deficit stress conditions**. *Proteomics*, v.9, n.9, p.2503-2528.

Gunes, A.; Inal, A.; Alpaslan, M.; Erasian, F.; Bagci, E. G. e Cicek, N. 2007. **Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity**. *Journal of Plant Physiology*, v.164, p.728-736.

Hajlaoui, H.; El Ayeb, N.; Garrec, J. P. e Denden, M. 2010. **Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties**. *Industrial Crops and Products*, v.31, n.1, p.122-130.

Hanson, A. D. e Scott, N. A. 1980. **Betaine Synthesis from Radioactive Precursors in Attached, Water-Stressed Barley Leaves**. *Plant Physiology*, v.66, n.2, p.342-348.

Hara, M.; Cascio, M. e Sawa, A. 2006. **GAPDH as a sensor of NO stress**. *Biochimica et biophysica acta*, v.1762, n.5, p.502-509.

Harmer, S. L.; Hogenesch, J. B.; Straume, M.; Chang, H. S.; Han, B.; Zhu, T.; Wang, X.; Kreps, J. A. e Kay, S. A. 2000. **Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock**. *Science*, v.290, p.2110-2113.

Hartl, F. U. 1996. **Molecular chaperones in cellular protein folding**. *Nature*, v.381, n.6583, p.571-580.

Hodges, D. M.; Delong, J. M.; Forney, C. F. e Prange, R. K. 1999. **Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds**. *Planta*, v.207, n.4, p.604-611.

Hoffmann, H. P.; Santos, E. G. D.; Bassinello, A. I. e Vieira, M. A. S. Variedades RB de Cana-de-açúcar. Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar - Centro de Ciências Agrárias - UFSCar. Araras - SP, p.30. 2008

Hsiao, T. C. e Xu, L. K. 2000. **Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport**. *Journal of Experimental Botany*, v.51, n.350, p.1595-1616.

Hu, Y. C. e Schmidhalter, U. 1998. **Spatial distributions and net deposition rates of mineral elements in the elongating wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf under saline soil conditions**. *Planta*, v.204, n.2, p.212-219.

Hurkman, W. J.; Tao, H. P. e Tanaka, C. K. 1991. **Germin-like polypeptides increase in barley roots during salt stresses**. *Plant Physiology*, v.97, p.37-43.

Ingelbrecht, I. L.; Irvine, J. E. e Mirkov, T. E. 1999. **Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome**. *Plant Physiology*, v.119, n.4, p.1187-1197.

Irigoyen, J.; Emerich, D. e Sanchez-Diaz, M. 1992. **Alfalfa leaf senescence induced by drought stress : photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution**. *Physiologia Plantarum*, v.84, p.67-72.

Iwata, S.; Lee, J. W.; Okada, K.; Lee, J. K.; Iwata, M.; Rasmussen, B.; Link, T. A.; Ranaswamy, S. e Jap, B. K. 1998. **Complete Structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex**. *Science*, v.281, p.64-71.

Jain, R.; Srivastava, S.; Solomon, S.; Shrivastava, A. K. e Chandra, A. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). Acta Physiologiae Plantarum 2010.

Jangpromma, N.; Kitthaisong, S.; Daduang, S.; Jaisil, P. e Thammastirak, S. 2007. **18 kDa protein accumulation in sugarcane leaves under drought stress conditions**. *KMITL Science and Technology Journal*, v.7, n.1, p.44-54.

Jangpromma, N.; Kitthaisong, S.; Lomthaisong, K.; Daduang, S.; Jaisil, P. e Thammastirak, S. 2010. **A Proteomics Analysis of Drought Stress-Responsive**

Proteins as Biomarker for Drought-Tolerant Sugarcane Cultivars. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v.6, n.2, p.89-102.

Jiang, Y.; Yang, B.; Harris, N. e Deyholos, M. 2007. **Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots.** *Journal of Experimental Botany*, v.58, n.13, p.3591-3607.

Kamel, M. e El-Tayeb, M. A. 2004. **K⁺/Na⁺ soil-plant interactions during low salt stress and their role in osmotic adjustment in faba beans.** *Spanish Journal of Agricultural Research*, v.2, n.2, p.257-265.

Kang, D.; Gho, Y. S.; Suh, M. e Kang, C. 2002. **Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.** *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v.23, n.11, p.1511-1512.

Khedr, A. H. A.; Abbas, M. A.; Wahid, A. A. A.; Quick, W. P. e Abogadallah, G. M. 2003. **Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress.** *Journal of Experimental Botany*, v.54, n.392, p.2553-2562.

Kieffer, P.; Dommès, J.; Hoffmann, L.; Hausman, J.-F. e Renaut, J. 2008. **Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants.** *Proteomics*, v.8, n.12, p.2514-2530.

Kim, D.; Rakwal, R.; Agrawal, G.; Jung, Y.; Shibato, J.; Jwa, N.; Iwahashi, Y.; Iwahashi, H.; Kim, D.; Shim, I. e Usui, K. 2005. **A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf.** *Electrophoresis*, v.26, p.4521-4539.

Kim, H. J.; Pesacreta, T. C. e Triplett, B. A. 2004. **Cotton-fiber germin-like protein. II: Immunolocalization, purification and functional analysis.** *Planta*, v.218, p.525-535.

Kreps, J. A.; Wu, Y.; Chang, H.-S.; Zhu, T.; Wang, X. e Harper, J. F. 2002. **Transcriptome Changes for *Arabidopsis* in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress.** *Plant Physiology*, v.130, p.2129-2141.

Lacerda, C. F.; Júnior, J. O. A.; Filho, L. C. A. L.; Oliveira, T. S. D.; Guimarães, F. V. A.; Gomes-Filho, E.; Prisco, J. T. e Bezerra, M. A. 2006. **Respostas morfofisiológicas de folhas de feijão-de-corda ao estresse salino.** *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.18, n.4, p.455-465.

Laemmli, U. K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, v.15, n.227, p.680-685.

Lange, A.; Martines, A. M.; Silva, M. A. C. D.; Sorreano, M. C. M.; Cabral, C. P. e Malavolta, E. 2005. **Efeito de deficiência de micronutrientes no estado nutricional da mamoneira cultivar Iris.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, n.1, p.61-67.

Li, G.; Wan, S.; Zhou, J.; Yang, Z. e Qin, P. 2010. **Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels.** *Industrial Crops and Products*, v.31, p.13-19.

Libardi, D. e Cardoso, N. A. 2007. **Cana de açúcar: a salvação da lavoura ou do planeta?** . *Análise Conjuntural*, v.29, n.5-6, p.24.

Lindquist, S. 1986. **The heat-shock response**. *Annual Review of Biochemistry*, v.55, p.1151-1191.

Lindquist, S. e Craig, E. A. 1988. **The heat-shock proteins**. *Annual Review of Genetics*, v.22, p.631-677.

Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. e Rj., R. 1951. **Protein measurement with the folin phenol reagent**. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275.

Lutts, S.; Kinet, J. M. e Bouharmont, J. 1996. **NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance**. *Annals of Botany*, v.78, p.389-398.

Lutts, S.; Majerus, V. e Kinet, J. M. 1999. **NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings**. *Physiologia Plantarum*, v.105, n.3, p.450-458.

Mayer, M. P. e Bukau, B. 2005. **Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism**. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.62, n.6, p.670-684.

Mccue, K. F. e Hanson, A. D. 1990. **Drought and Salt Tolerance - Towards Understanding and Application**. *Trends in Biotechnology*, v.8, n.12, p.358-362.

Melo, L. J. O. T. D. Análise Agronômica e Genética de genótipos de cana-de-açúcar nas regiões litoral sul e mata norte de Pernambuco. (Dissertação). Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005. 91 p.

Menossi, M.; Silva-Filho, M. C.; Vincentz, M.; Van-Sluys, M.-A. e Souza, G. M. 2008. **Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for Agronomic Trait Development**. *International Journal of Plant Genomics*, v.2008, p.1-11. 10.1155/2008/458732

Miranda, J. R. História da cana-de-açúcar. Campinas-SP: Komedi. 2008. 167 p.

Mistry, J. World savannas: ecology and human use: London: Prentice Hall. 2000. 344 p.

Mohammad, D.; Shibli, R.; Ajlouni, M. e Nimri, L. 1998. **Tomato root and shoot responses to salt stress under different levels of phosphorus nutrition**. *Journal of Plant Nutrition*, v.21, n.8, p.1667-1680.

Molinari, H. B. C. Expressão estresse-induzida do gene P5CS em plantas transgênicas de cana de açúcar submetidas ao déficit hídrico. (Doutorado). Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Paraná-SC, 2006. 109 p.

Molinari, H. B. C.; Marur, C. J.; Bessalho-Filho, J. C.; Kobayashi, A. K.; Pileggi, M.; Leite-Júnior, R. P.; Pereira, L. F. P. e Vieira, L. G. E. 2004. **Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Obs. X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline**. *Plant Science*, v.167, p.1375-1381.

Molinari, H. B. C.; Marur, C. J.; Daros, E.; Campos, M. K. F. D.; Carvalho, J. F. R. P. D.; Filho, J. C. B.; Pereira, L. F. P. e Vieira, L. G. E. 2007. **Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress.** *Physiologia Plantarum* v.130, p.218-29.

Monquero, P. A. 2005. **Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas.** *Bragantia* v.64, n.3, p.517-531.

Monte, W. B.; Hernandez, F. F. F.; Lacerda, C. F. D. e Ness, R. L. L. 2004. **Crescimento e teores de minerais em plantas jovens de duas cultivares de bananeira submetidas a estresse salino.** *Revista Ciência Agronômica*, v.35, p.157-164.

Moons, A.; Gielen, J.; Vandekerckhove, J.; Vanderstraeten, D.; Gheysen, G. e Vanmontagu, M. 1997. **An abscisic-acid- and salt-stress-responsive rice cDNA from a novel plant gene family.** *Planta*, v.202, n.4, p.443-454.

Moradi, F. e Ismail, A. M. 2007. **Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-Scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice.** *Annals of Botany*, v.99, n.6, p.1161-1173.

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

Munns, R. 2005. **Genes and salt tolerance: bringing them together.** *The New Phytologist*, v.167, n.3, p.645-663.

Munns, R.; Guo, J.; Passioura, J. B. e Cramer, G. R. 2000. **Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley.** *Australian Journal of Plant Physiology*, v.27, p.949-957.

Muntean, D. W. 2010. **Boron, the overlooked essential element, disponível em www.soilandplantlaboratory.com/pdf/.../BoronOverlookedEssential.pdf . www.soilandplantlaboratory.com/pdf/.../BoronOverlookedEssential.pdf 12/05**

N.C.B.I. 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 21/07/2010

Nenova, V. 2008. **Growth and mineral concentrations of pea plants under different salinity levels and iron supply.** *General and Applied Plant Physiology*, v.34, n.3-4, p.189-202.

Neto, A. D. D. A.; Prisco, J. T.; Enéas-Filho, J.; Lacerda, C. F. D.; Silva, J. V.; Costa, P. H. A. D. e Gomes-Filho, E. 2004. **Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes.** *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.16, n.1, p.31-38.

Netondo, G. W.; Onyango, J. C. e Beck, E. 2004. **Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress.** *Crop Science*, v.44, n.3, p.806-811.

Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D. e Ehrhardt, W. 1988. **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** *Electrophoresis*, v.9, n.6, p.255-262.

Neves, A. L. R.; Lacerda, C. F. D.; Guimarães, F. V. A.; Filho, E. G. e Feitosa, D. R. C. 2009. **Trocas gasosas e teores de minerais no feijão-de-corda irrigado com água salina em diferentes estádios.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.13, p.873-881.

Neves, O. S. C.; Carvalho, J. G. D.; Oliveira, E. V. D. e Neves, V. B. F. 2008. **Crescimento, nutrição mineral e nível crítico foliar de p em mudas de umbuzeiro, em função da adubação fosfatada.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, n.3, p.801-805.

Noctor, G. e Foyer, C. H. 1998. **Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.49, p.249-279.

Nogueira, A. R. D. A. Manual de Laboratório: Solo, Água Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos. São Carlos-SP: Embrapa Pecuária Sudeste. 2005

Ohmiya, A.; Tanaka, Y.; Kadowak, K. e Hayashi, T. 1998. **Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP19/20) from peach: significant peptide sequence similarity with germin-like proteins.** *Plant and Cell Physiology*, v.39, p.492-499.

Oliveira, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. In: Gheyi, H. R., Queiroz, J. E., *et al* (Ed.). Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. Campina Grande: UFPB-SBEA, 1997. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais.

Ono, M.; Sage-Ono, K.; Inoue, M.; Kamada, H. e Harada, H. 1996. **Transient increase in the level of mRNA for a germin-like protein in leaves of the short-day plant *Pharbitis nil* during the photoperiodic induction of flowering.** *Plant and Cell Physiology*, v.37, p.855-886.

Palhares, D.; Franco, A. C. e Zaidan, L. B. P. 2010. **Respostas fotossintéticas de plantas de cerrado nas estações seca e chuvosa.** *Revista Brasileira de Biociências*, v.8, n.2, p.213-220.

Parker, R.; Flowers, T. J.; Moore, A. L. e Harpham, N. V. J. 2006. **An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina.** *Journal of Experimental Botany*, v.57, n.5, p.1109-1118.

Plaut, Z.; Meinzer, F. C. e Federman, E. 2000. **Leaf development, transpiration and ion uptake and distribution in sugarcane cultivars grown under salinity.** *Plant and Soil*, v.218, n.1-2, p.59-69.

Quirino, B. F.; Candido, E. S.; Camposa, P. F.; Franco, O. L. e Krüger, R. H. 2010. **Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions.** *Phytochemistry*, v.71, n.4, p.351-362.

Razavizadeh, R.; Ehsanpour, A. A.; Ahsan, N. e Komatsu, S. 2009. **Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress.** *Peptides*, v.30, p.1651-1659.

Reddy, A. R.; Chaitanya, K. V. e Vivekanandan, M. 2004. **Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in high plants.** *Journal of Plant Physiology*, v.161, p.1189-1202.

Requena, L. e Bornemann, S. 1999. **Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme.** *Biochemistry Journal*, v.343, p.185-190.

Rhodes, D. e Hanson, A. D. 1993. **Quaternary Ammonium and Tertiary Sulfonium Compounds in Higher-Plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.44, p.357-384.

Richter, C. e Schweizer, M. Oxidative stress in mitochondria. In: Scandalios, J. G. (Ed.). Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Oxidative stress in mitochondria, p.169-200

Robinson, S. P. e Jones, G. P. 1986. **Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress.** *Australian Journal of Plant Physiology*, v.13, p.659-668.

Rodrigues, F. A.; Laia, M. L. D. e Zingaretti, S. M. 2009. **Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants.** *Plant Science*, v.176, p.286-302.

Rodrigues, G. S. e Irias, L. J. M. Considerações sobre os Impactos Ambientais da Agricultura Irrigada. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP, p.1-7. 2004

Rodriguez-Lopez, M.; Baroja-Fernandez, E.; Zanduetta-Criado, A.; Moreno-Bruna, B.; Munoz, F. J.; Akazawa, T. e Pozueta-Romero, J. 2001. **Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein.** *FEBS Letters*, v.490, p.44-48.

Rodríguez, M.; Canales, E. e Borrás-Hidalgo, O. 2005. **Molecular aspects of abiotic stress in plants.** *Biotecnología Aplicada*, v.29, p.1-10.

Roosens, N. H.; Bitar, F. A. L.; Loenders, K.; Angenon, G. e Jacobs, M. 2002. **Overexpression of orthione- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants.** *Molecular Breeding*, v.9, p.73-80.

Rutherford, R. S. The assessment of proline accumulation as a mechanism of drought resistance in sugarcane. Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association 1989.

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

Sahi, C.; Singh, A.; Blumwald, E. e Grover, A. 2006. **Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data.** *Physiologia Plantarum*, v.127, n.1, p.1-9.

Sairam, R. K. e Tyagi, A. 2004. **Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants.** *Current Science*, v.86, n.3, p.407-421.

Sakamoto, A. e Murata, N. 2000. **Genetic engineering of rice leading to biosynthesis of glycine betain and tolerance to salt and cold.** . *Plant Molecular Biology*, v.51, p.81-88.

Salekdeh, G. H.; Siopongco, J.; Wade, L. J.; Ghareyazie, B. e Bennett, J. 2002a. **Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery.** *Proteomics*, v.2, n.9, p.1131-1145.

Salekdeh, G. H.; Siopongco, J.; Wade, L. J.; Ghareyazie, B. e Bennett, J. 2002b. **A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice.** *Field Crops Research*, v.76, n.2-3, p.199-219.

Santos, A. D. S.; Valle, M. L. M. e Giannini, R. G. Adição de compostos oxigenados na gasolina e a experiência do ProÁlcool. Economia & Energia. 19 2000.

Santos, C. L. V.; Campos, A.; Azevedo, H. e Caldeira, G. 2001. **In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism.** *Journal of Experimental Botany*, v.52, n.355, p.351-360.

Santos, D. R.; Gatiboni, L. C. e Kaminski, J. 2008. **Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto.** *Ciência Rural*, v.38, p.576-586.

Scholander, P. F.; Hammel, H. T.; Hemmingsen, E. A. e Bradstreet, E. D. 1964. **Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.52, p.119-125.

Schweizer, P.; Christoffel, A. e Dudler, R. 1999. **Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance.** *Plant Journal*, v.20, p.540-552.

Sengupta, S. e Majumder, A. L. 2009. **Insight into the salt tolerance factors of a wild halophytic rice, *Porteresia coarctata*: a physiological and proteomic approach.** *Planta*, v.229, n.4, p.911-929.

Shao, H.-B.; Chu, L.-Y.; Wu, G.; Zhang, J.-H.; Lu, Z.-H. e Hu, Y.-C. 2007. **Changes of some anti-oxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.54, p.143-149.

Shaul, O. 2002. **Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg.** *Biometals*, v.15, n.3, p.309-323.

Shevchenko, A.; Tomas, H.; Breve, J. H.; Olsen, J. V. e Mann, M. 2007. **In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes.** *Nature Protocols*, v.1, p.2856 - 2860.

Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O. e Mann, M. 1996. **Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.** *Analytical Chemistry*, v.68, n.5, p.850-858.

Singh, M. P.; Singh, D. K. e Rai, M. 2007. **Assessment of Growth, Physiological and Biochemical Parameters and Activities of Antioxidative Enzymes in Salinity Tolerant and Sensitive Basmati Rice Varieties.** *Journal of Agronomy & Crop Science*, v.193, p.398-412. 10.1111/j.1439-037X.2007.00267.x

Staut, L. A. 2010. **Condições dos solos para o cultivo de cana-de-açúcar.** http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/CanaSolo/index.htm 20/07/2010

Stepien, P. e Johnson, G. N. 2009. **Contrasting Responses of Photosynthesis to Salt Stress in the Glycophyte Arabidopsis and the Halophyte Thellungiella: Role of the Plastid Terminal Oxidase as an Alternative Electron Sink.** *Plant Physiology*, v.149, n.2, p.1154-1165.

Stepien, P. e Klobus, G. 2005. **Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress.** *Physiologia Plantarum*, v.125, p.31-40.

Stepien, P. e Klobus, G. 2006. **Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress.** *Biologia Plantarum*, v.50, n.4, p.610-616.

Sternberg, L. S. L.; Bucci, S.; Franco, A. C.; Goldstein, G.; Hoffman, W. A.; Meinzer, F. C.; Moreira, M. Z. e Scholz, F. 2004. **Long range lateral root activity by neo-tropical savanna trees.** *Plant and Soil*, v.270, p.169-178.

Sucest-Fun. 2010. <http://sucest-fun.org/en/projects/sucest-fun/overview>

Sule, A.; Vanrobaeys, F.; Hajos, G.; Van Beeumen, J. e Devreese, B. 2004. **Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots.** *Phytochemistry*, v.65, n.12, p.1853-1863.

Summart, J.; Thanonkeo, P.; Panichajakul, S.; Prathepha, P. e Mcmanus, M. T. 2010. **Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture.** *African Journal of Biotechnology*, v.9, n.2, p.145-152.

Sung, D.; Vierling, E. e Guy, C. 2001. **Comprehensive expression profile analysis of the arabidopsis Hsp70 gene family.** *Plant Physiology*, v.126, n.2, p.789-800.

Tada, Y. e Kashimura, T. 2009. **Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the Mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza*.** *Plant and Cell Physiology*, v.50, n.2, p.439-446.

Taiz, L. e Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*: Porto Alegre: Artmed. 2004. 719 p.

Takahashi, S. e Murata, N. 2008. **How do environmental stresses accelerate photoinhibition?** *Trends in Plant Science* v.13, n.4.

Thomson, E. W. e Lane, B. G. 1980. **Relation of protein synthesis in imbibing wheat embryos to the cell-free translational capacities of bulk mRNA from dry and imbibing embryos.** *Journal of Biological Chemistry*, v.255, p.5965-5970.

Tirolí-Cepeda, A. O. e Ramos, C. H. I. 2010. **Heat causes oligomeric disassembly and increases the chaperone activity of small heat shock proteins from sugarcane.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v.48, n.2-3, p.108-116.

Tirolí, A. O. e Ramos, C. H. I. 2007. **Biochemical and biophysical characterization of small heat shock proteins from sugarcane: Involvement of a**

specific region located at the N-terminus with substrate specificity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, n.4, p.818-831.

Tsugane, K.; Kobayashi, K.; Niwa, Y.; Wada, K. e Kobayashi, H. 1999. **A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification.** *Plant Cell*, v.11, n.7, p.1195-1206.

Tunçturk, M.; Tunçturk, R. e Yasar, F. 2008. **Changes in micronutrients, dry weight and plant growth of soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars under salt stress.** *African Journal of Biotechnology*, v.7, n.11, p.1650-1654.

Unica. 2008. **União da Indústria de Cana-de-açúcar**
[http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode={A43F7CB8-CC05-4424-A4CE-BAEF0077DD88}](http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode={A43F7CB8-CC05-4424-A4CE-BAEF0077DD88)

Vallelian-Bindschedler, L.; Mosinger, E.; Metraux, J. P. e Schweizer, P. 1998. **Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (*Hordeum vulgare* L.) that is insolubilized in stressed leaves.** *Plant Molecular Biology* v.37, p.297-308.

Van Den Berg, M.; Burrough, P. A. e Driessen, P. M. 2000. **Uncertainties in the appraisal of water availability and consequences for simulated sugar cane yield potentials in São Paulo State, Brazil.** *Agricrop Ecosystems; Environment*, v.81, p.43-55.

Van Dillewijn, C. Botany of sugarcane: Waltham, Mass: Chronica Botanica Co. 1952

Verslues, P. E.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Zhu, J. H. e Zhu, J. K. 2006. **Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status.** *Plant Journal*, v.45, n.4, p.523-539.

Vettore, A. L.; Da Silva, F. R.; Kemper, E. L.; Souza, G. M.; Da Silva, A. M.; Ferro, M. I.; Henrique-Silva, F.; Giglioti, E. A.; Lemos, M. V.; Coutinho, L. L.; Nobrega, M. P.; Carrer, H.; Franca, S. C.; Bacci Junior, M.; Goldman, M. H.; Gomes, S. L.; Nunes, L. R.; Camargo, L. E.; Siqueira, W. J.; Van Sluys, M. A.; Thiemann, O. H.; Kuramae, E. E.; Santelli, R. V.; Marino, C. L.; Targon, M. L.; Ferro, J. A.; Silveira, H. C.; Marini, D. C.; Lemos, E. G.; Monteiro-Vitorello, C. B.; Tambor, J. H.; Carraro, D. M.; Roberto, P. G.; Martins, V. G.; Goldman, G. H.; De Oliveira, R. C.; Truffi, D.; Colombo, C. A.; Rossi, M.; De Araujo, P. G.; Sculaccio, S. A.; Angella, A.; Lima, M. M.; De Rosa Junior, V. E.; Siviero, F.; Coscrato, V. E.; Machado, M. A.; Grivet, L.; Di Mauro, S. M.; Nobrega, F. G.; Menck, C. F.; Braga, M. D.; Telles, G. P.; Cara, F. A.; Pedrosa, G.; Meidanis, J. e Arruda, P. 2003. **Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane.** *Genome Res*, v.13, n.12, p.2725-35.

Vian, C. E. F. 2010. **EMBRAPA-CNPTIA**
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_120_22122006154842.html Acessado em 24/03/2010

Vidal, M. D. F.; Romero, R. E. e Oliveira, T. S. D. 2000. **Imobilização de nutrientes e Produção de matéria seca em condições de salinidade e sodicidade crescente no solo.** *Ceres*, v.47, n.272, p.363-373.

Vinocur, B. e Altman, A. 2005. **Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations.** *Current Opinion in Biotechnology*, v.16, n.2, p.123-132.

Wang, R.; Chen, S.; Deng, L.; Fritz, E.; Hüttermann, A. e Polle, A. 2007. **Leaf photosynthesis, fluorescence response to salinity and the relevance to chloroplast salt compartmentation and anti-oxidative stress in two poplars.** *Trees*, v.21, p.581-591.

Wang, R. L.; Hua, C.; Zhou, F. e Zhou, Q. C. 2009. **Effects of NaCl stress on photochemical activity and thylakoid membrane polypeptide composition of a salt-tolerant and a salt-sensitive rice cultivar.** *Photosynthetica*, v.47, n.1, p.125-127.

Wang, W.; Scali, M.; Vignani, R.; Spadafora, A.; Sensi, E.; Mazzuca, S. e Cresti, M. 2003. **Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds.** *Electrophoresis*, v.24, n.14, p.2369-2375.

Wang, W.; Vinocur, B.; Shoseyov, O. e Altman, A. 2004. **Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response.** *Trends in Plant Science*, v.9, n.5, p.244-252.

Wang, W. X.; Vinocur, B. e Altman, A. 2003. **Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance.** *Planta*, v.218, n.1, p.1-14.

Wang, X.; Yang, P.; Gao, Q.; Liu, X.; Kuang, T.; Shen, S. e He, Y. 2008. **Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*.** *Planta*, v.228, p.167-177.

Weimberg, R.; Lerner, H. R. e Poljakoffmayber, A. 1984. **Changes in Growth and Water-Soluble Solute Concentrations in *Sorghum bicolor* Stressed with Sodium and Potassium-Salts.** *Physiologia Plantarum*, v.62, n.3, p.472-480.

Wilkins, M. R.; Sanches, J.-C.; Gooley, A. A.; Appel, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D. F. e William, K. F. 1996. **Progress in proteome project: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.** *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, v.13, p.19-50.

Willadino, L.; Martins, M. H. B.; Camara, T. R.; Andrade, A. G. e Alves, G. D. 1999. **Resposta de genótipos de milho ao estresse salino em condições hidropônicas.** *Scientia Agricola*, v.56, p.1209-1213.

Witzel, K.; Weidner, A.; Surabhi, G.-K.; Börner, A. e Mock, H.-P. 2009. **Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity.** *Journal of Experimental Botany*, v.60, n.12, p.3545-3557.

Woo, E.; Dunwell, J.; Goodenough, P.; Marvier, A. e Pickersgill, R. 2000. **Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities.** *Nature Structural & Molecular Biology*, v.7, p.1036-1040.

Xu, C. e Huang, B. 2008. **Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance.** *Journal of Experimental Botany*, v.59, n.15, p.4183-4194.

Yan, S.; Tang, Z.; Su, W. e Sun, W. 2005. **Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root.** *Proteomics*, v.5, p.235-244. 10.1002/pmic.200400853

Yang, C. W.; Xu, H. H.; Wang, L. L.; Liu, J.; Shi, D. C. e Wang, D. L. 2009. **Comparative effects of salt-stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants.** *Photosynthetica*, v.47, n.1, p.79-86.

Yang, F.; Xiao, X.; Zhang, S.; Korpelainen, H. e Li, C. 2009. **Salt stress responses in *Populus cathayana* Rehder.** *Plant Science*, v.176, p.669-677.

Yang, W.-J.; Rich, P. J.; Axtell, J. D.; Wood, K. V.; Bonham, C. C.; Ejeta, G.; Michelbart, M. V. e Rhodes, D. 2003. **Genotypic variation for glycine betaine in sorghum.** *Crop Science*, v.43, p.162-169.

Zhang, J. X.; Nguyen, H. T. e Blum, A. 1999. **Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants.** *Journal of Experimental Botany*, v.50, n.332, p.291-302.

Zhu, J. K. 2001. **Cell signaling under salt, water and cold stresses.** *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, n.5, p.401-406.

Zörb, C.; Schmitt, S.; Neeb, A.; Karl, S.; Linder, M. e Schubert, S. 2004. **The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by mitigation of symptoms and not by specific adaptation.** *Plant Science*, v.167, p.91-100.

Anexos

Untitled

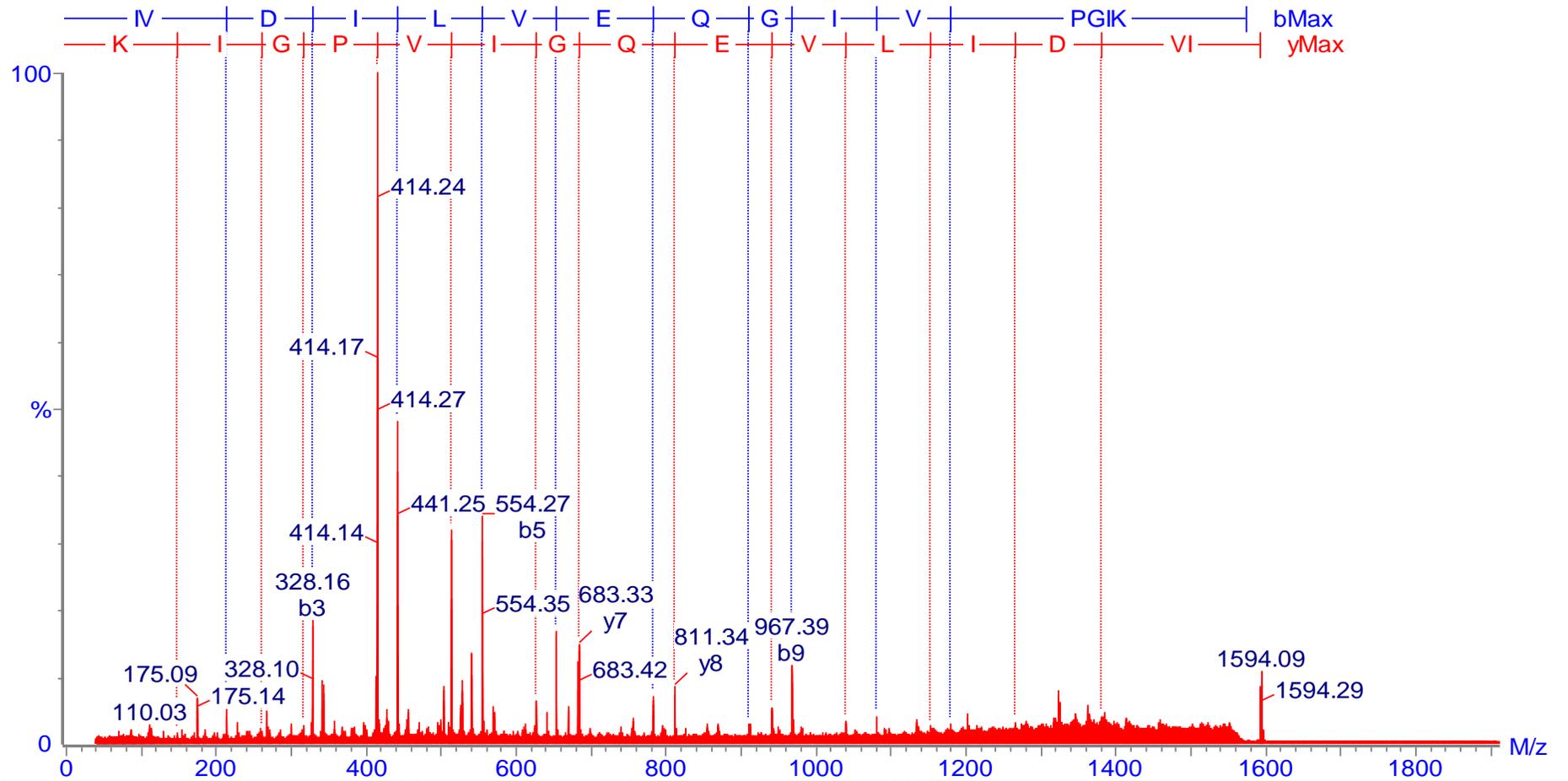


Figura 36: Gráfico de MS/MS da proteína Frutose 1,6-bifosfato aldolase (s1 ↓) provinda da variedade RB867515.

Untitled

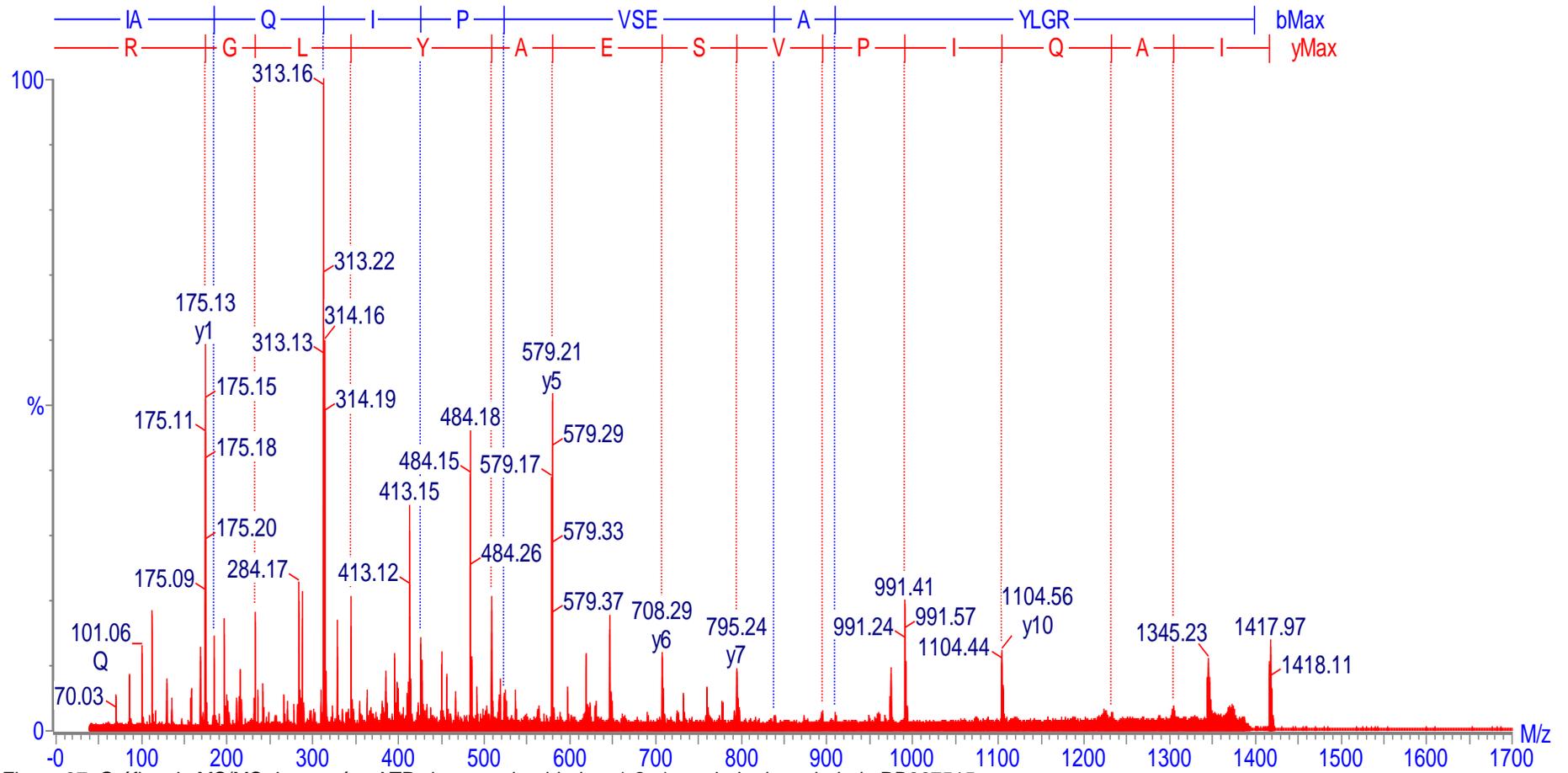


Figura 37: Gráfico de MS/MS da proteína ATP sintase subunidade α (s2 =) provinda da variedade RB867515

Untitled

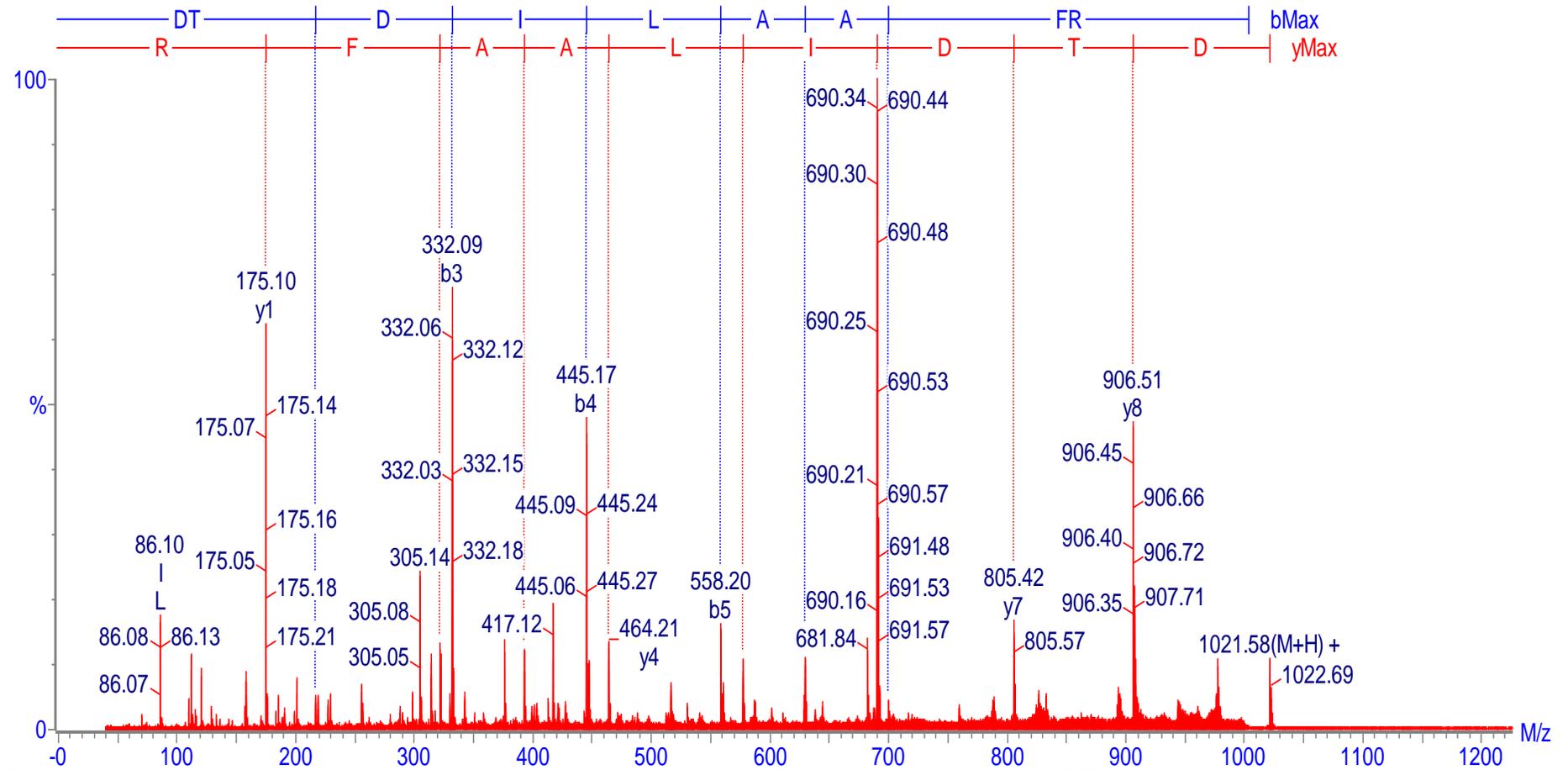


Figura 38: Gráfico de MS/MS da proteína Ribulose 1,5-Bisphato carboxilase/oxigenase (s3 =) provinda da variedade RB867515

Untitled

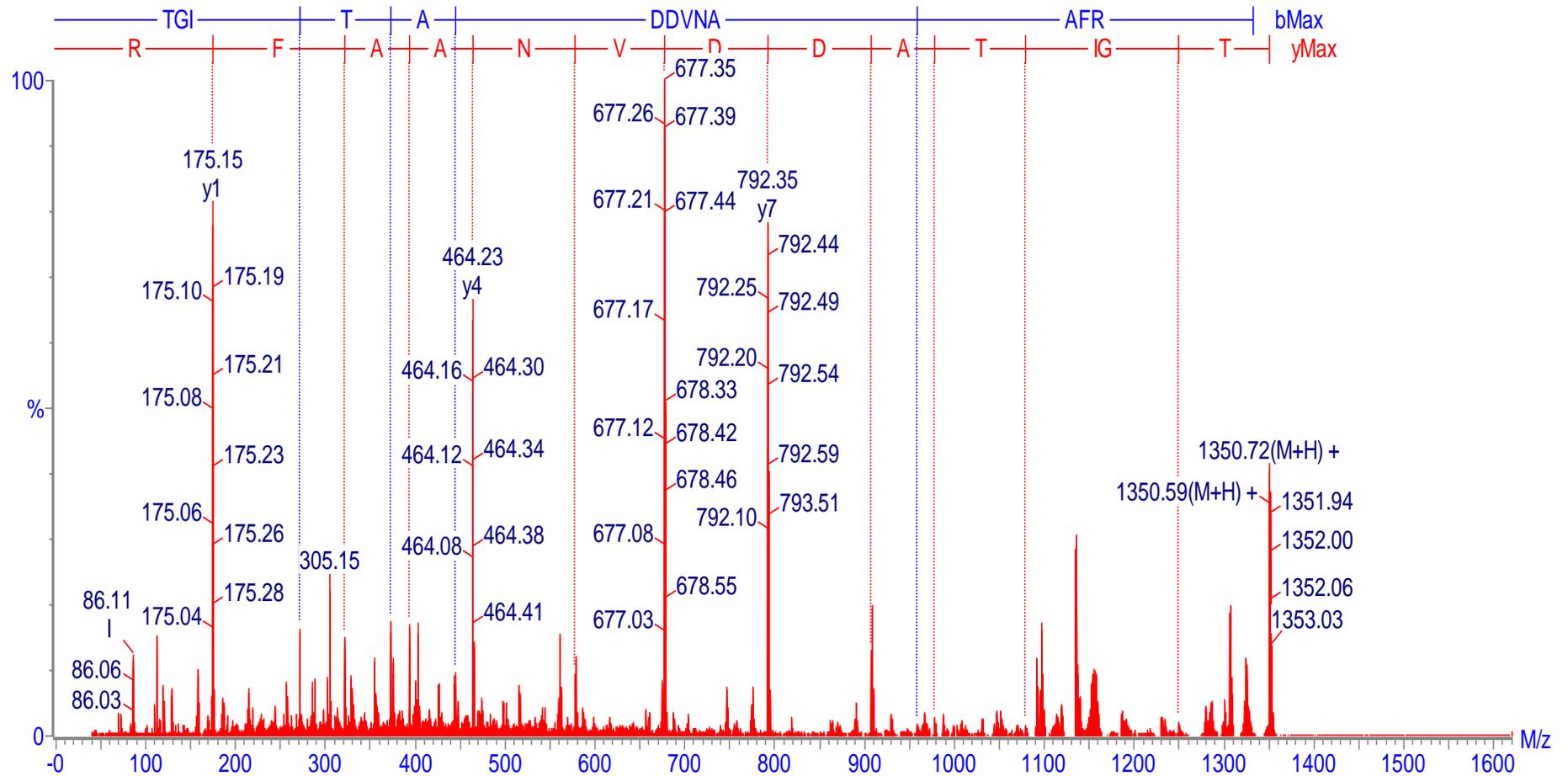


Figura 39: Gráfico de MS/MS da proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (s4 ↑) provinda da variedade RB867515

Untitled

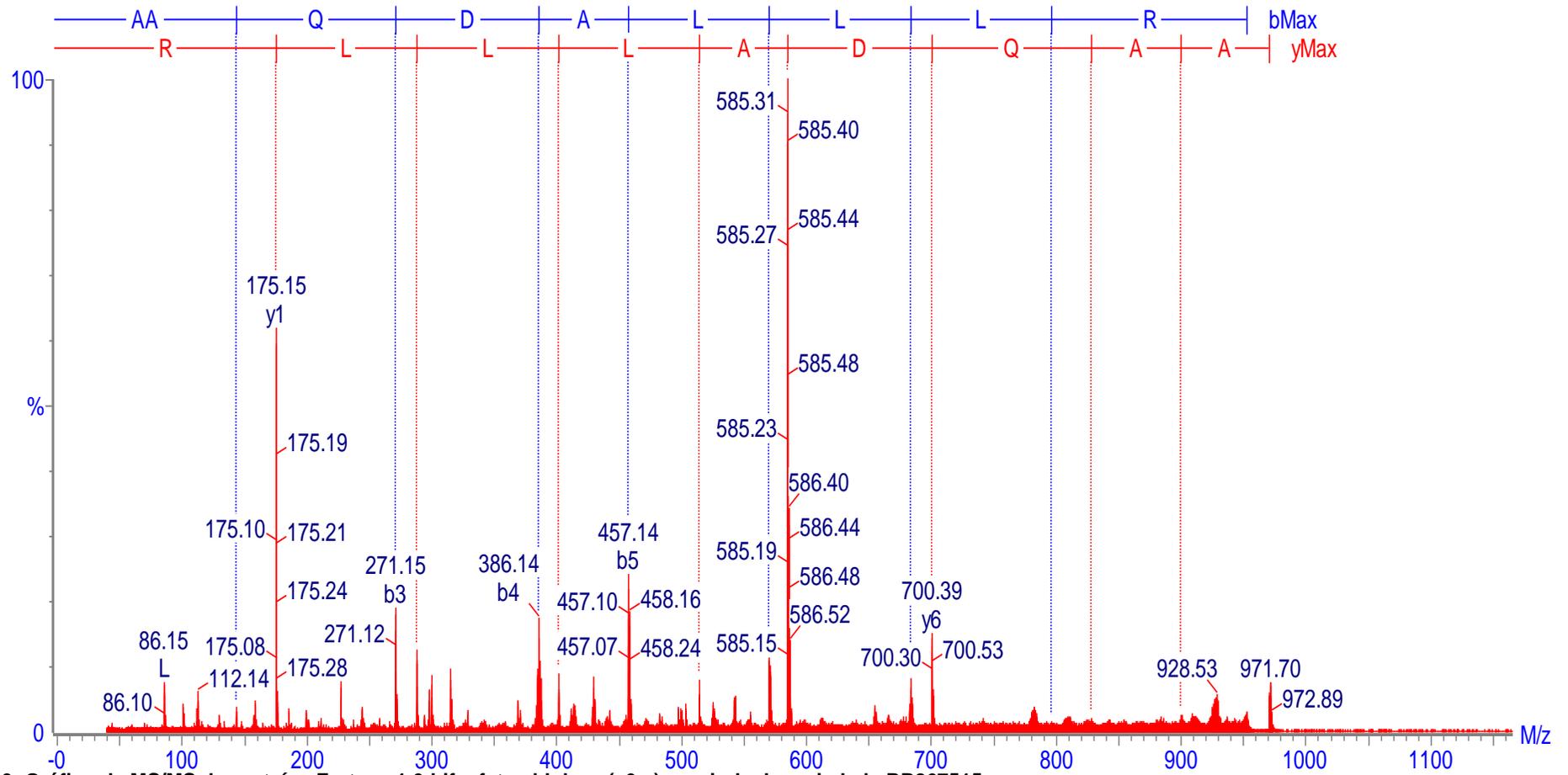


Figura 40: Gráfico de MS/MS da proteína Frutose 1,6-bifosfato aldolase (s6 =) provinda da variedade RB867515

Untitled

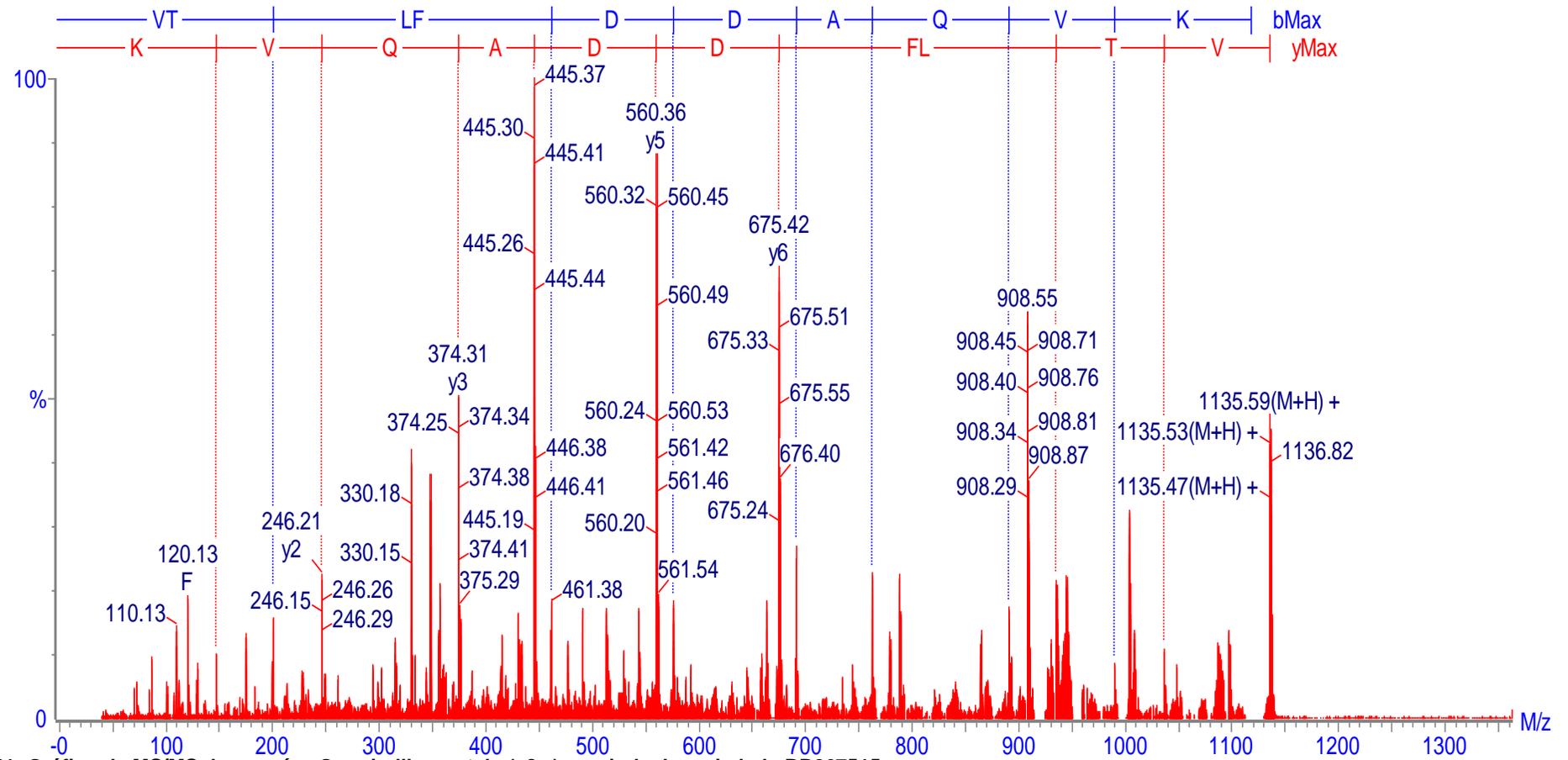


Figura 41: Gráfico de MS/MS da proteína Germin-like protein (s8 ↑) provinda da variedade RB867515

Untitled

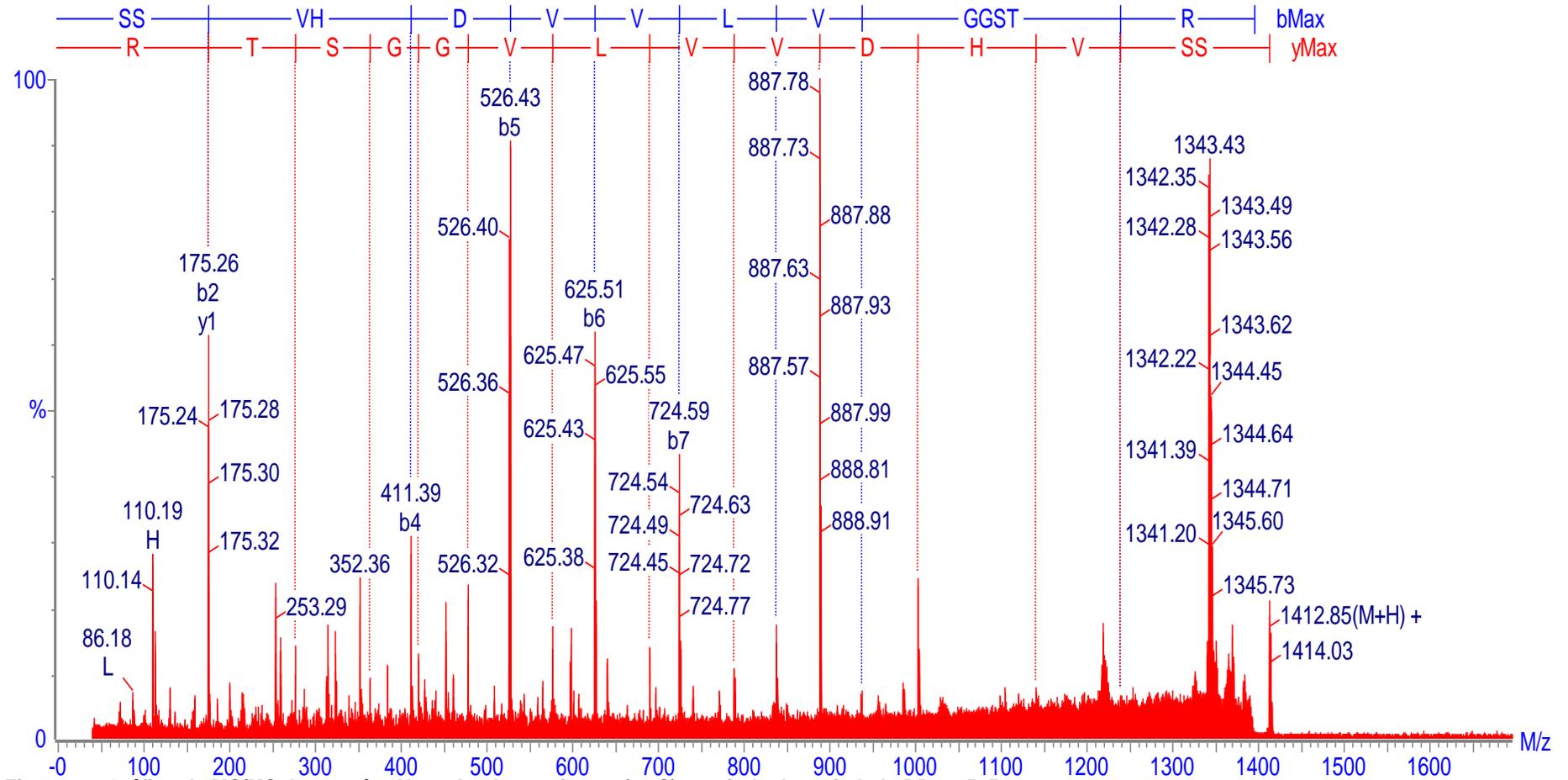


Figura 42: Gráfico de MS/MS da proteína Heat shock proteins 70 (s9 S) provinda da variedade RB867515

Untitled

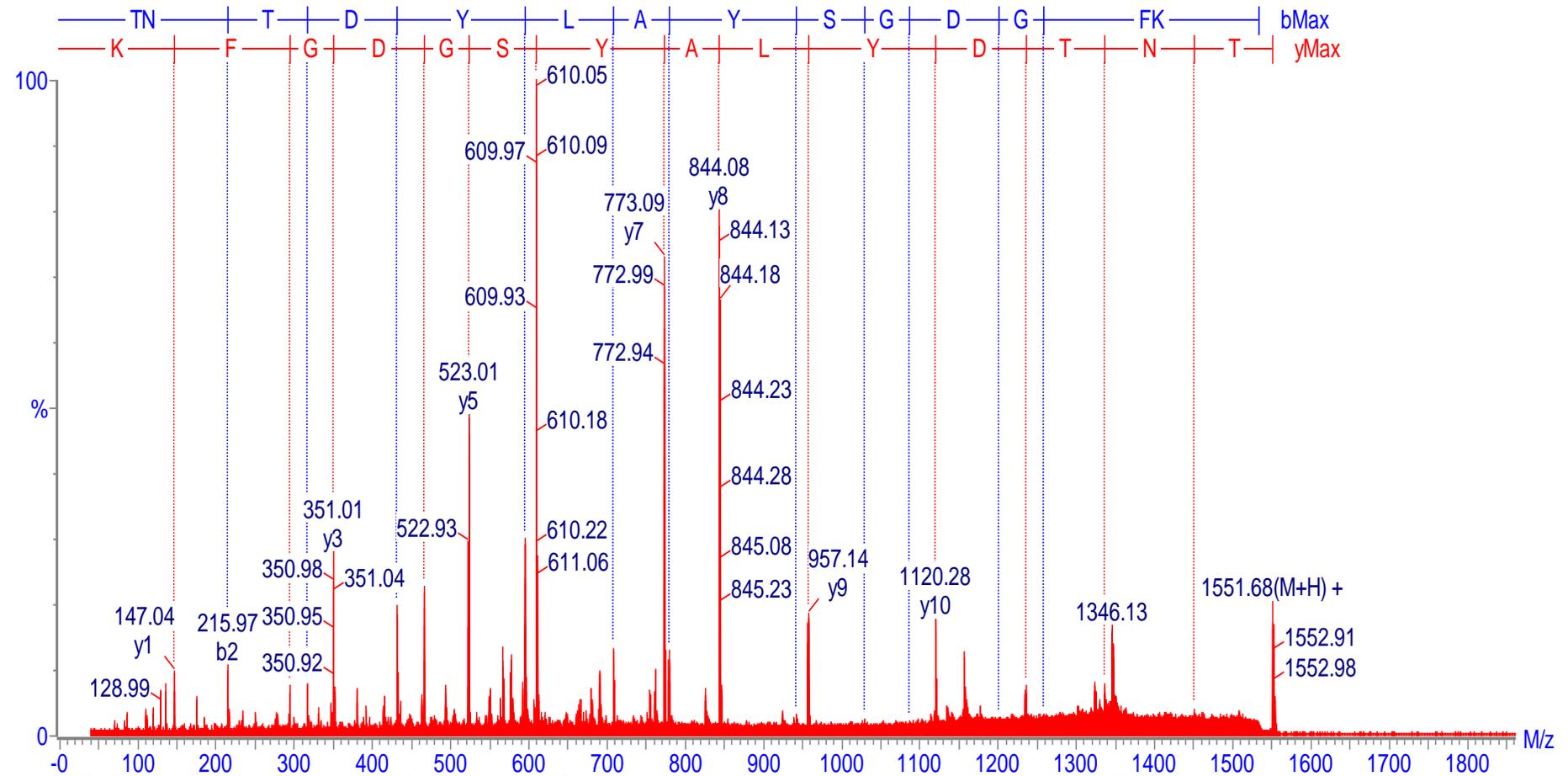


Figura 43: Gráfico de MS/MS da proteína Polipeptídeo de 23 kDa do Fotossistema II (s15 =) provinda da variedade RB867515

Untitled

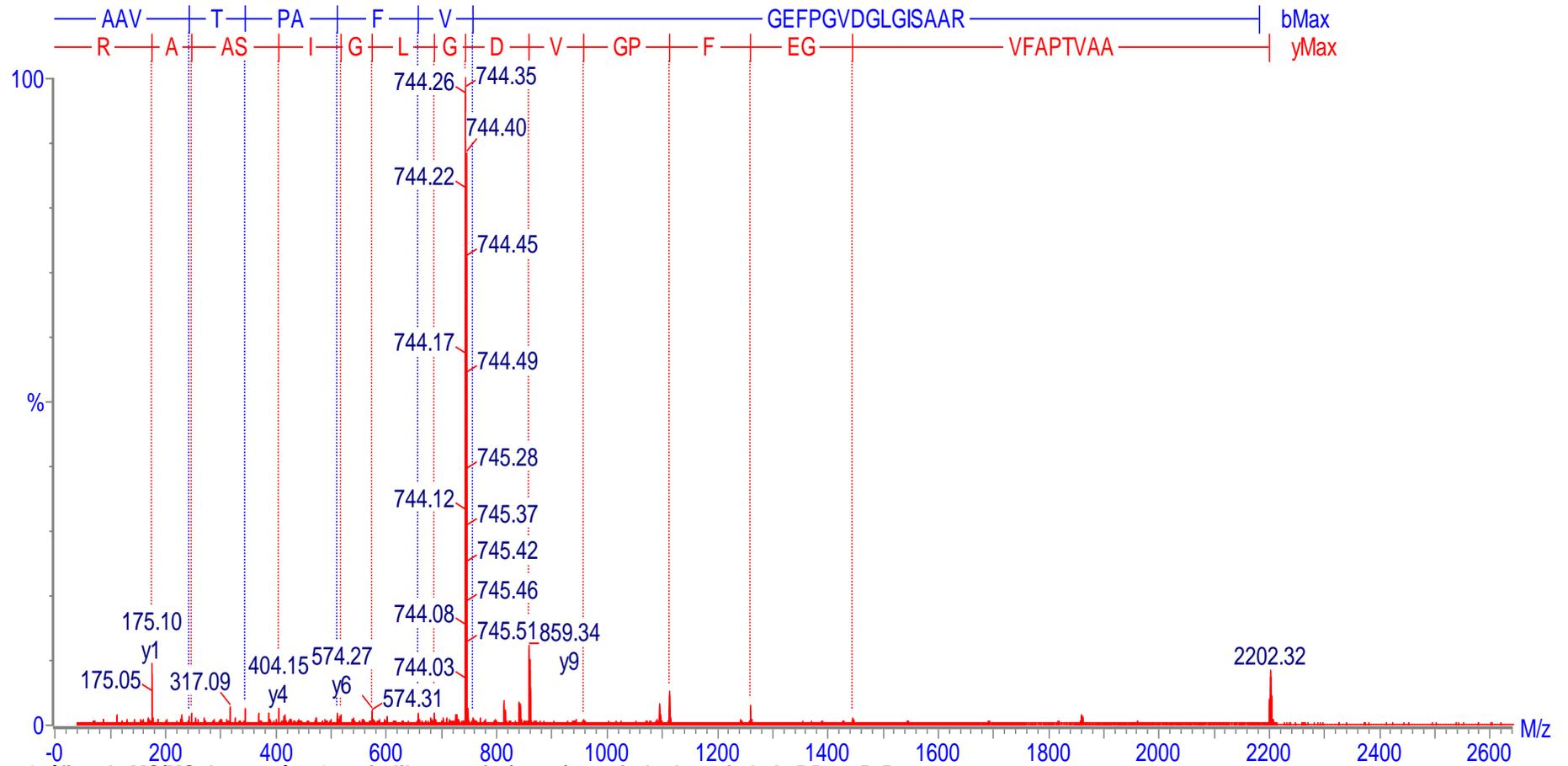


Figura 44: Gráfico de MS/MS da proteína Germin-like protein (s17 =) provinda da variedade RB867515

Untitled

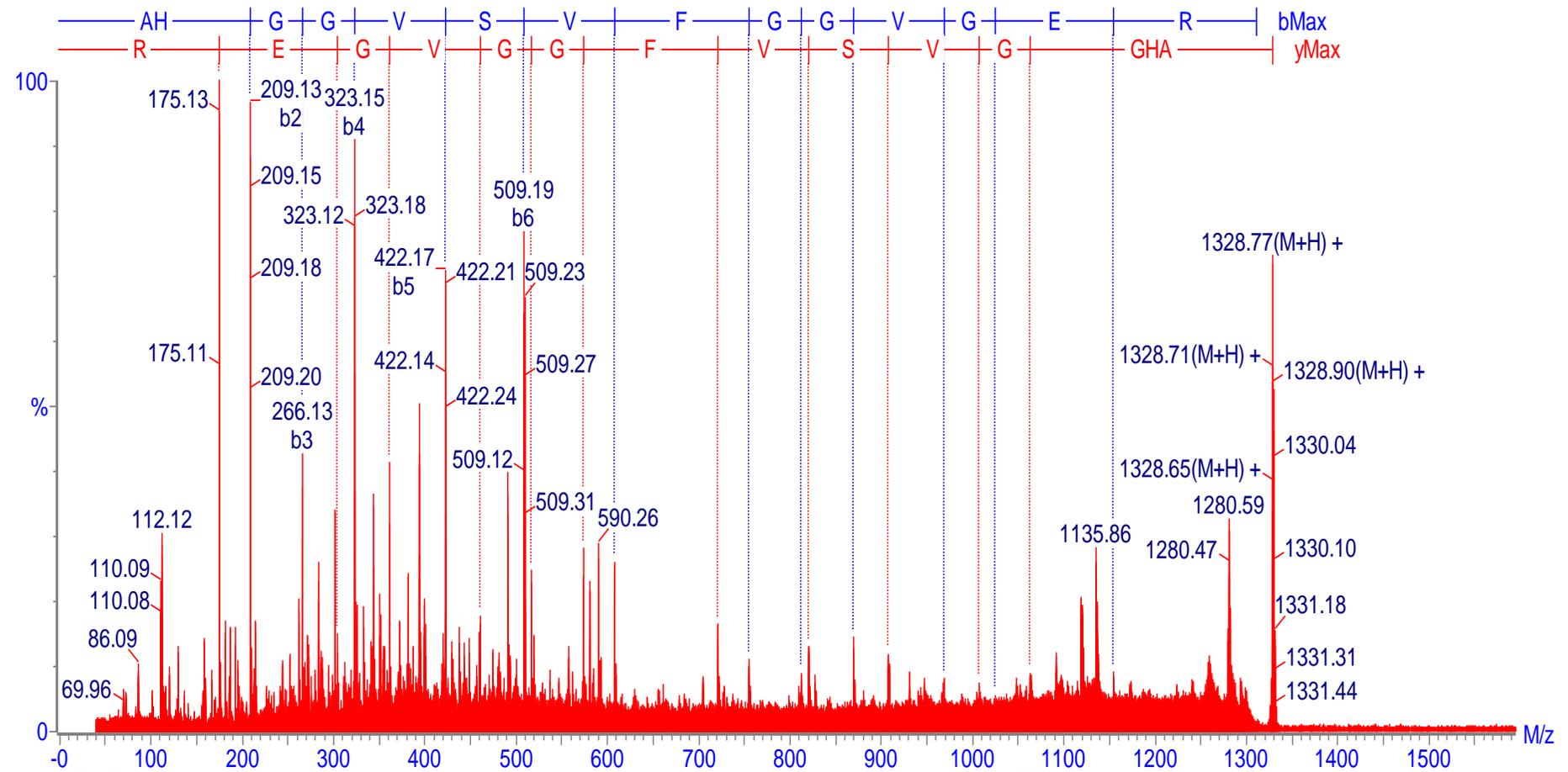


Figura 45: Gráfico de MS/MS da proteína ATP sintase subunidade β (s19) provinda da variedade RB855536

Untitled

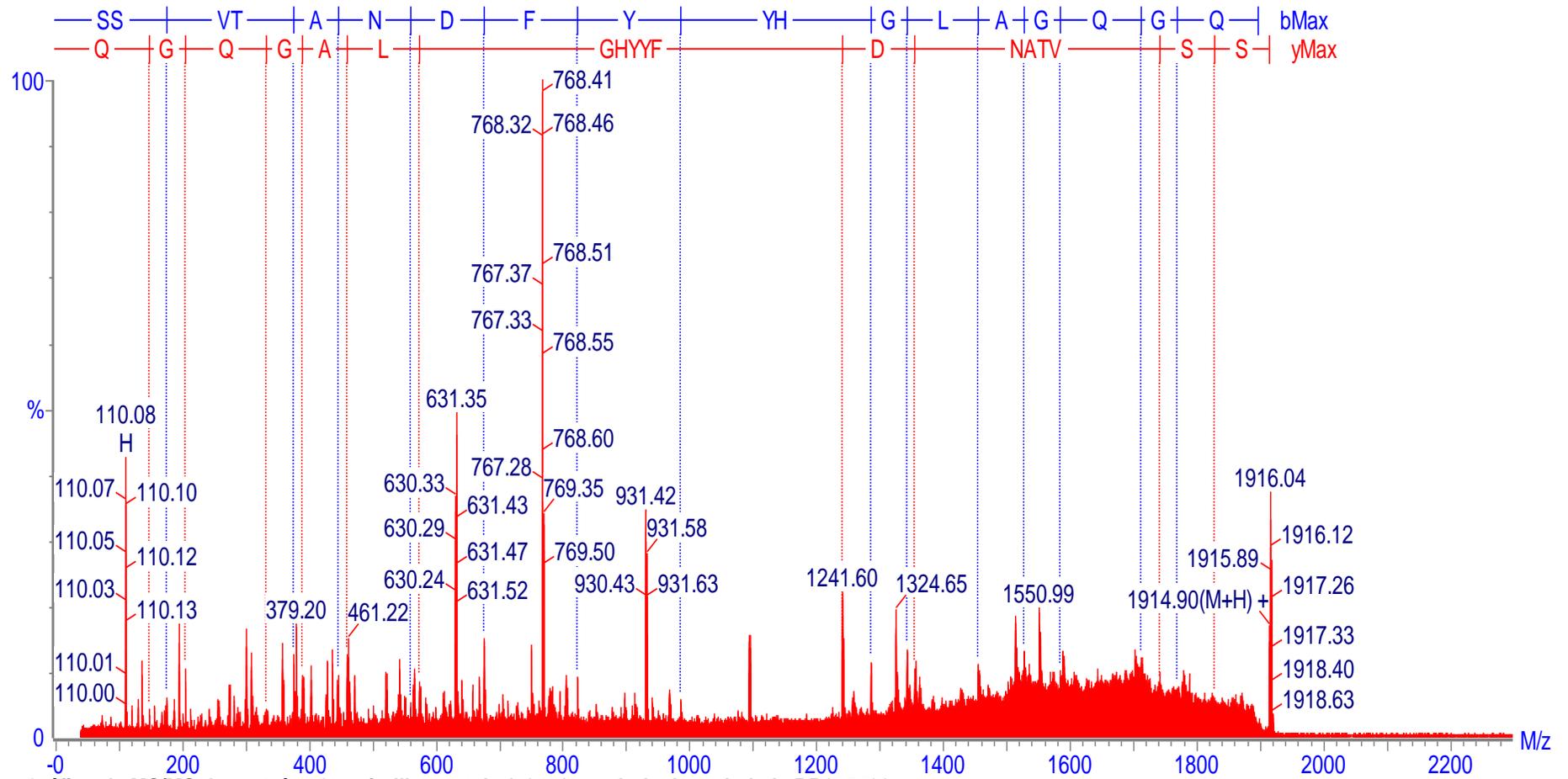


Figura 46: Gráfico de MS/MS da proteína Germin-like protein (s24 ↑) provida da variedade RB855536

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)